

研究论文

Sprague-Dawley与Wistar大鼠双侧颈总动脉结扎后大脑病理变化和认知功能的差异

孙伟[#], 耿悦[#], 陈叶婷, 唐小杭, 张永杰, 顾胜华, 谢家骏, 张泽安, 田雪松^{*}

上海中医药大学创新中药研究院, 上海 201203

摘要: 本文旨在研究Sprague-Dawley (SD)与Wistar大鼠双侧颈总动脉结扎(bilateral common carotid artery occlusion, BCCAO)后的大脑病理变化及认知功能差异。雄性SD和Wistar大鼠分别随机分为2组: 假手术(S-sham和W-sham)组与手术(S-BCCAO和W-BCCAO)组。BCCAO术后1、3、7、14及28 d, 观察各组存活率及瞳孔对光反射(pupillary light reflex, PLR)消失率; 术后28 d行明暗箱、Y迷宫及新气味识别测试, 检测大鼠认知功能; 用HE和Luxol fast blue染色法观察灰质(海马)、白质(视束)、视神经和视网膜的病理改变。结果显示, W-BCCAO组大鼠的存活率为62.5%, PLR全部消失; S-BCCAO组大鼠的存活率100%, PLR消失率为58.3%。和各自的假手术组相比, W-BCCAO组大鼠在明箱的滞留时间及活动距离比例均显著增加, S-BCCAO组大鼠则无明显变化; S-BCCAO组大鼠在Y迷宫III臂(迷宫臂)的滞留时间及活动距离比例均显著减少, 而W-BCCAO组大鼠无明显变化; S-BCCAO组大鼠的新气味识别比率显著降低, 而W-BCCAO组大鼠无明显变化。S-BCCAO组大鼠海马CA1区可见缺血性损伤, 而W-BCCAO组无明显损伤; S-BCCAO及W-BCCAO组大鼠均可见视束、视神经缺血性损伤; S-BCCAO、W-BCCAO大鼠视网膜损伤明显, 总厚度明显变薄, 其中S-BCCAO组大鼠可见节细胞层(ganglion cell layer, GCL)、内网层(inner plexiform layer, IPL)及外网层(outer plexiform layer, OPL)变薄, 其它各层与S-sham组相比无显著差异, W-BCCAO组大鼠除外核层(outer nuclear layer, ONL)外, 其余各层与W-sham组相比均变薄。上述结果表明, SD和Wistar大鼠BCCAO术后海马和视觉传导通路病理变化存在差异, 学习记忆损伤程度也有所不同, 提示应根据研究目的选择不同品系大鼠建立血管性痴呆模型。

关键词: 脑缺血; 血管性痴呆; 双侧颈总动脉结扎; 视网膜

中图分类号: R332; R363.2; R743.3

Differences of brain pathological changes and cognitive function after bilateral common carotid artery occlusion between Sprague-Dawley and Wistar rats

SUN Wei[#], GENG Yue[#], CHEN Ye-Ting, TANG Xiao-Hang, ZHANG Yong-Jie, GU Sheng-Hua, XIE Jia-Jun, ZHANG Ze-An, TIAN Xue-Song^{*}

Innovation Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: The aim of the present study was to investigate the differences of the pathological changes and cognitive function after bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) between Sprague-Dawley (SD) and Wistar rats. Male SD and Wistar rats were randomly divided into 2 groups, respectively: sham operated (S-sham and W-sham) and operated (S-BCCAO and W-BCCAO) groups. The survival rate and the rate of loss of pupillary light reflex (PLR) were observed on day 1, 3, 7, 14 and 28 after the opera-

Received 2018-12-10 Accepted 2019-05-17

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81574078, 81072646) and Natural Science Foundation of Shanghai, China (No. 16ZR1434300).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding authors. Tel: +86-21-51322399; E-mail: xuesong.tian@shutcm.edu.cn

tion, and the light-dark box, Y-maze and odor recognition tests were performed to detect cognitive function on day 28 after the operation. HE and Luxol fast blue staining were used to observe the pathological changes of gray matter (hippocampus), white matter (optical tract), optic nerve, and retina. The results showed that the survival rate of the W-BCCAO group was 62.5%, and PLR loss rate was 100%; whereas the survival rate of the S-BCCAO group was 100%, and PLR loss rate was 58.3%. In the W-BCCAO group, percentages of time spent and distance traveled in the light box of were more than those in the W-sham group, but there was no statistical significance between the S-BCCAO and S-sham groups. In the S-BCCAO group, the percentages of time spent and distance traveled in the III arm (labyrinth arm) of the Y-maze were less than those in the S-sham group, but no statistical significance was found between the W-BCCAO group and W-sham group. In the S-BCCAO group, the discrimination ratio of the odor recognition task was less than that in the S-sham group, but no statistical significance could be seen between the W-BCCAO and W-sham groups. Ischemic injury was observed in the CA1 area of the hippocampus in the S-BCCAO group, but no readily visible damage was observed in the W-BCCAO group. Ischemic injury of the visual beam and optic nerve was observed in both the S-BCCAO and W-BCCAO groups. Compared with the corresponding sham groups, the S-BCCAO and W-BCCAO groups showed serious retinal damage with significant thinner retina. The ganglion cell layer (GCL), inner plexiform layer (IPL), and outer plexiform layer (OPL) were thinner in the S-BCCAO group, but no statistical significances were shown in the other layers. All the layers, except the outer nuclear layer (ONL), were significantly thinner in the W-BCCAO group. The results indicate that there are differences of the pathological changes in the hippocampus and visual conduction pathway after BCCAO between SD and Wistar rats, and the degree of learning and memory injury was also different, which suggests that the vascular dementia model of different rat strains should be selected according to research purpose.

Key words: cerebral ischemia; vascular dementia; bilateral occlusion of the common carotid arteries; retina

血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 又称为血管性认知功能障碍 (vascular cognitive impairment, VCI), 是由各种脑血管病引起的获得性智能损害和认知功能障碍的综合征, 在老年人群中高发, 约占所有痴呆病例的 20%, 仅次于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)^[1]。迄今为止, VaD 的发生、发展机制尚不明确, 但是普遍认为, 缺血性脑损伤是导致 VaD 的主要原因, 脑血流的降低出现在 VaD 发病之前, 大脑的长期低灌注状态诱发了 VaD 和与之相伴的认知障碍^[1, 2], 且脑血流量的降低程度与痴呆发生的严重程度密切相关^[3–5]。

大鼠脑部与人脑相似, 具有完整的 Willis 环, 其可在双侧颈总动脉结扎 (bilateral common carotid artery occlusion, BCCAO) 后继续为大脑提供不间断、但流量减少的血液供应, 而沙鼠和大多数品系的小鼠因 Willis 环的后交通动脉缺乏或不发达导致 BCCAO 后出现严重脑缺血^[6]。因此, 自 1972 年 Eklof 等^[7]首次采用大鼠 BCCAO 模型研究脑不完全缺血条件下的能量代谢以来, 经典及各种改良的 BCCAO 模型被广泛应用于 VaD 的研究中, 其优点在于可诱导慢性脑灌注不足, 引发海马、脑白质损伤和学习与记忆障碍等。但是文献报道中 BCCAO 模型的病理变化却不尽相同、甚至截然相反。有研究显示, BCCAO 模型大鼠的主要组织病理学改变集中于白质, 而灰质则无显著改变^[8, 9], Tian 等^[10]

和 Guo 等^[11]研究亦显示, BCCAO 后大鼠白质 (视束) 及视网膜受损, 而灰质 (海马) 无明显改变; 不过也有研究显示, BCCAO 导致大鼠海马 CA1 区锥体细胞的死亡, 而脑白质无明显改变^[12–14]。值得注意的是, 以上这些研究选用了不同品系大鼠, 这提示我们: BCCAO 后实验对象病理改变的差异有可能源于大鼠品系的不同。为验证这一猜想, 本研究选用 Wistar 和 Sprague-Dawley (SD) 两种品系大鼠, 比较 BCCAO 后二者灰质 (海马)、白质 (视束)、视神经和视网膜的主要病理学改变。此外, 通过明暗箱、Y 迷宫及新气味识别的行为学检测方法对两种品系大鼠进行认知功能评价, 以期明确 BCCAO 后两种品系大鼠的大脑病理改变和认知功能障碍的差异, 为后续研究中不同品系大鼠 VaD 模型的选择提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 动物实验方案获得上海中医药大学实验动物伦理委员会批准, 实验程序均严格按照标准执行。体重 250~300 g 的健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 24 只、Wistar 大鼠 36 只, 上海斯莱克实验动物有限公司提供, 许可证号码: SCXK(沪)2012-0002。大鼠饲养于 SPF 级饲养室内, 温度 (22 ± 2) °C, 湿度 40%~70%, 12 h/12 h 明暗交替, 自由摄食饮水。适应性饲养 3 d, 雄性 SD 大鼠随机分为 2 组: 假手

术(S-sham)组与手术(S-BCCAO)组($n = 12/\text{组}$); 雄性Wistar大鼠随机分为3组, 假手术(W-sham)组、手术组1(W-BCCAO1)和手术组2(W-BCCAO2)($n = 12/\text{组}$), 术后W-BCCAO1和W-BCCAO2合并为W-BCCAO组($n = 15$), 最终分为2组, 即W-sham组与W-BCCAO组。

1.2 试剂和仪器 异氟烷购自河北一品制药股份有限公司(批号: C002170902); 水合氯醛购自国药集团化学试剂有限公司(批号: 20180420), 使用生理盐水配制成10%溶液; 注射用青霉素钠购自华北制药股份有限公司(批号: F7012116), 使用前用生理盐水配成80 000 IU/mL溶液; 庚酸购自阿达玛斯试剂有限公司(批号: P1039752); 丁酸己酯购自阿达玛斯试剂有限公司(批号: P1413985)。吸入式小动物麻醉机(Hsiv- μ 1, 上海瑞曼信息科技有限公司); 智能数字测温仪(AT320, 上海玉研科学仪器有限公司); 检耳镜(MacroView, 美国伟伦公司); 明暗箱(DigBehv-ST, 上海吉量软件科技有限公司); Y迷宫(DigBehv-YM, 上海吉量软件科技有限公司); 生物显微镜(BX43, Olympus Corporation, 日本)等。

1.3 双侧颈总动脉永久性结扎制作慢性脑缺血模型 大鼠术前称重, 异氟烷诱导麻醉后仰卧位固定于放置恒温垫的手术板上, 3%异氟烷(95%氧气、5%氮气混合气体)气体维持麻醉, 颈部剃毛后用2%碘酊溶液消毒手术区域, 75%乙醇脱碘, 用测温仪监测直肠温度, 使体温维持在(36.5 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。沿颈前正中线, 从胸骨上窝上缘向上做一纵向约1~1.5 cm切口, 钝性分离皮下组织, 暴露胸锁乳突肌与胸骨舌骨肌。用玻璃分针小心分离动脉鞘游离出颈总动脉, 不要过分牵拉血管以避免损伤迷走神经, 游离后置双股5-0号手术缝合线于颈总动脉下, 两根缝合线相邻约3 mm, 分别结扎颈总动脉。采取同样操作结扎对侧颈总动脉。W-sham与S-sham组仅暴露颈总动脉, 不进行其他操作。手术完毕后逐层缝合伤口, 2%碘酊消毒伤口并注射青霉素钠溶液(60 000 IU/kg, i.m.)抗炎, 放置于保温箱内, 待动物完全清醒后放回饲养笼内饲养。

1.4 大鼠生存状况观察和瞳孔对光反射(pupillary light reflex, PLR)检查 术后密切关注大鼠的死亡与存活状况, 记录术后1、3、7、14和28 d各组的存活情况。分别于术前、术后1、3、7、14和28 d观察各组大鼠PLR。观察方法为: 先将大鼠放入暗

室中暗适应5 min后, 用检耳镜光直接照射大鼠右眼, 观察右眼直接PLR情况, 同时立即观察对侧眼的间接PLR情况, 光线照射瞳孔10 s不收缩即为PLR消失^[15]; 关闭检耳镜将大鼠重新暗适应1 min, 同样方法检查左眼PLR情况, 依次检查所有大鼠。

1.5 明暗箱检测大鼠光线辨识能力 术后28 d使用明暗箱检测各组大鼠的光线辨识能力。实验装置如下: 暗箱(30 cm $\times$ 30 cm $\times$ 40 cm, 光强度10 lux)和明箱(30 cm $\times$ 30 cm $\times$ 40 cm, 光强度300 lux)中间有一小孔(10 cm $\times$ 12 cm)相连, 大鼠可通过此孔穿梭于暗箱和明箱之间。实验开始将大鼠置于明箱中央区域, 使用避暗视频分析系统(上海吉量软件科技有限公司)记录大鼠在明箱与暗箱中的活动时间、活动距离, 记录时间10 min。记录结束后取出大鼠并清理粪便和尿液, 75%酒精擦拭明暗箱, 待其挥发扩散后进行下一只动物的测试。

1.6 大鼠学习记忆能力检查 术后28 d使用Y迷宫分别检测各组大鼠的学习记忆能力, 检测方法如下: 提前1 h将大鼠放入昏暗的检测室内适应环境, 检测者用手轻轻安抚使其适应检测者的操作。训练阶段: 将Y迷宫的III臂(迷宫臂)用移动挡板挡住, 保持I臂(起始臂)与II臂(开放臂)联通, 将大鼠放于I臂, 头部面向迷宫的中心, 只允许探索联通的I与II臂, 训练8 min后取出大鼠, 清除大鼠残留粪便及尿液, 75%酒精棉球擦拭Y迷宫, 待挥发完毕后, 依次进行其它大鼠的训练。测试阶段: 训练完成1 h后, 将移动挡板取下, 开放III臂, 再次将大鼠放置于I臂, 让其在三个臂中探索8 min并使用Y迷宫视频分析系统(上海吉量软件科技有限公司)记录大鼠在I、II、III臂中的活动时间、活动距离。记录结束后取出大鼠并清理粪便和尿液, 75%酒精擦拭Y迷宫, 待其挥发扩散后进行下一只大鼠的检测。

参考Manella等^[16, 17]的方法, 于术后28 d通过大鼠对新气味的识别, 检测大鼠的记忆能力的改变。检测方法如下: 将动物提前2 min放入自发活动箱(40 cm $\times$ 40 cm $\times$ 50 cm)中适应环境, 于自发活动箱一侧放入两个直径6 cm的气味平皿, 其内铺有滤纸并滴加1 mL丁酸己酯(2%, v/v)。让大鼠在箱内自由探索5 min后, 放回动物饲养笼中。间隔30 min后, 将箱内气味平皿中的一个随机替换为同样大小的新气味平皿, 其内铺有滤纸并滴加有1 mL

的庚酸 (4.5%, v/v), 使大鼠在箱内再次自由探索 5 min。自发活动箱有摄像头进行视频记录, 以大鼠鼻端靠近气味平皿约 1 cm 记为识别气味, 分别记录识别原始气味与新气味的时间。记录结束后取出大鼠并清理粪便及尿液, 75% 酒精擦拭检测箱, 待其挥发完毕后进行下一只动物测试。

1.7 大鼠脑、视束及视神经样本 HE 染色检查 术后 28 d, 大鼠用 10% 水合氯醛麻醉 (400 mg/kg, i.p.) 后, 开颅取全脑后将脑组织 (含视神经) 入 4% 多聚甲醛中固定, 于视交叉向前、后端约 2 mm 处取冠状面脑组织, 经过组织脱水、透明和石蜡包埋后, 连续脑冠状面切片, 常规 HE 染色, 光学显微镜下对灰质 (海马)、白质 (视束) 及视神经进行观察及病理形态学分析。使用 cellSens 图像分析软件 (Entry1.18, Olympus Corporation, 日本) 进行拍照与图像分析。取颅内段视神经 1 mm, 制作矢状面 HE 染色切片, 进行炎性细胞浸润的等级评分。每只大鼠选取视神经的三个不重叠区域按 0 到 4 的等级进行分级: 无浸润 = 0, 轻度细胞浸润 = 1, 中度浸润 = 2, 严重浸润 = 3, 视神经实质大量浸润及结节浸润 = 4^[18]。每只大鼠视神经的平均分数用于统计分析。

1.8 大鼠脑、视束及视神经样本 Luxol fast blue (LFB) 染色检查 选取距离前囟 -2.64 ~ -3.36 mm 处^[19] 的脑组织及视神经, 行冠状石蜡切片, 经脱蜡后, 置于 0.1% LFB 染液 60 °C 孵育过夜, 纯水冲洗后浸入 95% 乙醇中固定约 10 s, 再浸入 0.05% 碳酸锂溶液中分化, 经脱水、透明后用中性树胶封片。对 LFB 染色的脑片进行白质 (视束) 损伤评分, 每只大鼠选取白质 (视束) 的三个不重叠区域按 0 到 3 的等级进行分级: 正常 = 0, 神经纤维紊乱 = 1, 空泡形成 = 2, 有髓纤维消失 = 3^[20]。每只大鼠白质 (视束) 损伤的平均分数用于统计分析。

1.9 眼球离体样本组织病理学检查与视网膜图像分析

1.9.1 眼球离体样本 HE 染色 术后 28 d, 大鼠用 10% 水合氯醛麻醉 (400 mg/kg, i.p.) 后, 快速摘除双侧眼球放入 Davidson 固定液 (冰醋酸: 无水乙醇: 40% 甲醛: 纯水 = 1:3:6:10) 中快速固定, 10~12 h 后取出置于 4% 多聚甲醛溶液中继续固定, 经过组织脱水, 透明, 石蜡包埋, 所有眼球均进行经过视神经的矢状面切片, 厚度 3 μ m, 常规 HE 染色后, 光学显微镜观察并图像分析。

1.9.2 视网膜及各细胞层厚度分析 参照 Ni 等^[21] 的方法, 选取包含有视网膜上方 12 点且经过视神

经乳头至下方 6 点的切片, 于 400 倍光学显微镜下, 使用 cellSens 图像分析软件 (Entry1.18, Olympus Corporation, 日本), 选取距离视神经乳头约 1 000~1 500 μ m 处为拍摄区域, 间隔 150 μ m 选取 3 处不重叠区域测量视网膜各细胞层厚度以及视网膜总厚度, 取平均值。

1.9.3 视网膜神经节细胞层细胞数量分析 选取清晰的包含有视网膜上方 12 点且经过视神经乳头至下方 6 点的切片, 于 200 倍光学显微镜下, 使用 cellSens 图像分析软件 (Entry1.18, Olympus Corporation, 日本), 选取距离视神经乳头约 1 000~1 500 μ m 处, 测量 3 处不重叠 500 μ m 区域, 并计数视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 数目, 取平均值计算每 500 μ m 长的视网膜所含 RGCs 数量^[22]。

1.10 数据处理和统计检验 使用 SPSS Statistics 21.0 软件 (IBM, 美国) 进行数据分析。各组数据以 mean $\pm$ SD 表示。计量数据采用独立样本 *t* 检验进行两组均数的比较; 生存率的比较采用 Log-rank 检验; PLR 消失率的比较采用卡方检验; 新气味辨识比率的比较采用 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BCCAO术对大鼠生存率的影响

W-BCCAO 组大鼠术后立即出现自发活动减少, 行动迟缓, 反应迟钝, 立毛, 饮食减少的状态, 1 d 开始出现死亡, 7 d 内生存率降到 62.5%, 之后未再出现大鼠死亡 (图 1)。S-BCCAO 组大鼠术后立即出现自发活动减少, 行动迟缓, 反应迟钝, 立毛, 饮食减少的状态, 3 d 后后逐渐恢复正常, 实验周期内未观察到大鼠死亡, 28 d 生存率为 100% (图 1)。W-sham 组与 S-sham 组在 1、3、7、14 和 28 d 均没有大鼠死亡, 28 d 生存率为 100% (图 1)。

2.2 BCCAO术对大鼠PLR消失率的影响

结果显示, W-BCCAO 组存活大鼠在 1、3 d 的双眼 PLR 消失率分别为 94.4%、100%, 与 W-sham 组相比具有统计学差异 (图 2, $P < 0.001$); S-BCCAO 组大鼠 7 d 的双眼 PLR 消失率为 58.3%, 与 S-sham 组相比具有统计学差异 (图 2, $P < 0.01$)。W-BCCAO 组与 S-BCCAO 组大鼠的 PLR 消失均发生在术后 7 d 以内, 之后再未观察到 PLR 改变。W-sham 组与 S-sham 组大鼠双眼均未观察到 PLR 消失。

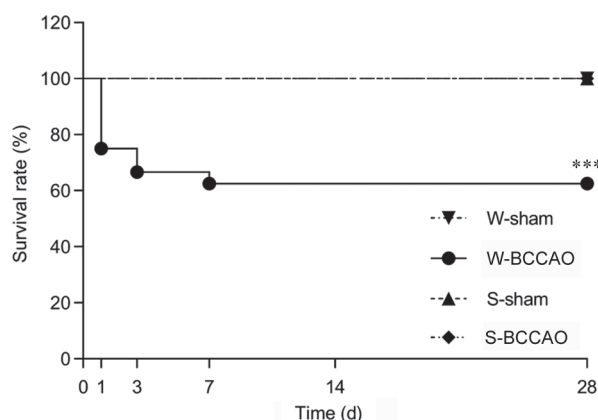


图 1. 双侧颈总动脉结扎(BCCAO)术对SD与Wistar大鼠生存率的影响

Fig. 1. Effects of bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) on survival rate in SD and Wistar rats. Survival rate was assessed before (0 d) and after BCCAO surgery (1, 3, 7, 14 and 28 d) using Kaplan-Meier survival analysis with Log-rank test. *** $P < 0.001$ vs W-sham group. $n = 12-15$ per group.

2.3 BCCAO术对大鼠光线辨别能力的影响

结果显示, S-BCCAO 组大鼠在明箱的活动时间 $[(35.8 \pm 18.9)\%]$ 及活动距离比例 $[(38.3 \pm 15.0)\%]$ 与 S-sham 组 $[(26.2 \pm 7.8)\%, (28.6 \pm 5.3)\%]$ 相比均增加, 但是没有统计学意义 (图 3A、B); W-BCCAO 组大鼠在明箱的活动时间 $[(47.7 \pm 5.2)\%]$ 、活动距离比例 $[(45.5 \pm 4.8)\%]$ 均大于 W-sham 组 $[(20.3 \pm 6.7)\%, (23.7 \pm 5.8)\%]$, 差异有统计学意义 (图 3A、B, $P < 0.001$), 表明 Wistar 大鼠光线辨别能力可能受损。

2.4 BCCAO术对大鼠学习记忆能力的影响

Y 迷宫是一个简单、有效的反映动物学习记忆能力改变的检测方法^[23]。结果显示, S-BCCAO 组大鼠在 III 臂 (迷宫臂) 的滞留时间 $[(22.7 \pm 12.5)\%]$ 及活动距离比例 $[(21.3 \pm 7.2)\%]$ 均小于 S-sham 组 $[(33.2 \pm 9.5)\%, (36.3 \pm 5.2)\%]$, 差异具有统计学意义 (图 3C、D, $P < 0.05$, $P < 0.001$); W-BCCAO 组大鼠在 III 臂 (迷宫臂) 的滞留时间 $[(21.0 \pm 9.9)\%]$ 及活动距离比例 $[(25.4 \pm 7.3)\%]$ 与 W-sham 组 $[(20.0 \pm 4.3)\%, (25.4 \pm 4.3)\%]$ 相比无统计学差异 (图 3C、D), 该结果表明 S-BCCAO 组大鼠对新臂的好奇程度要低于 S-sham 组, 这可能与学习记忆损伤相关。

新气味识别试验是用来检测动物嗅觉识别记忆的一种行为学检测方法^[16]。大鼠对新气味的偏爱使用辨别比率 (discrimination ratio, DR) 指标进行量化, $DR = N / (N + F)$, “N”表示测试时大鼠对新气味的

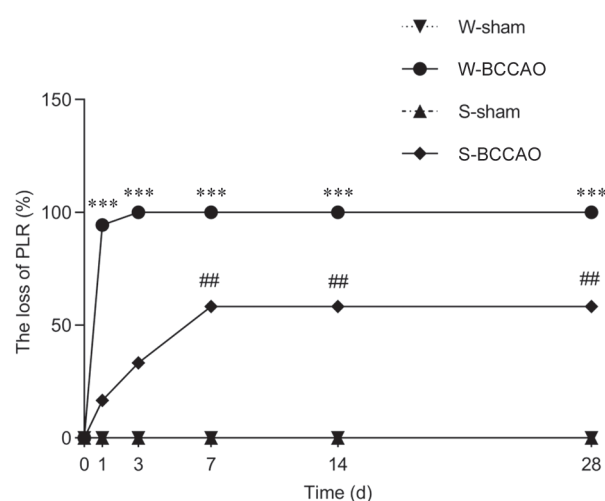


图 2. 双侧颈总动脉结扎(BCCAO)术对SD与Wistar大鼠瞳孔对光反射(PLR)消失率的影响

Fig. 2. Effects of bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) on pupillary light reflex (PLR) loss rate in SD and Wistar rats. Direct and indirect PLR were examined before (0 d) and after surgery (1, 3, 7, 14 and 28 d) using Chi-squared test. ## $P < 0.01$ vs S-sham groups; *** $P < 0.001$ vs W-sham group. $n = 12-15$ per group.

探索时间, “F”表示测试期时大鼠对原始气味的探索时间。结果显示, S-BCCAO 组大鼠的辨别比率 (0.46 ± 0.08) 小于 S-sham 组 (0.64 ± 0.12) , 差异具有统计学意义 (图 3E, $P < 0.05$); W-BCCAO 组大鼠的辨别比率 (0.59 ± 0.15) 与 W-sham 组 (0.54 ± 0.16) 相比无统计学差异 (图 3E)。该结果表明 S-BCCAO 组大鼠对新气味的偏爱程度要明显低于 S-sham 组, 这可能与记忆能力损伤相关。

2.5 BCCAO术对大鼠海马CA1区、视束及视神经的影响

大鼠灰质 (海马) 区域 HE 染色结果显示, S-sham、W-sham 组大鼠海马的神经细胞排列整齐致密, 细胞结构完整, 胞浆丰富, 细胞核呈圆形或椭圆形, 无变性, 无固缩或溶解现象 (图 4A); S-BCCAO 组有 2 只大鼠海马 CA1 区存在少数深染、核固缩、形态不规则的神经细胞, 考虑为海马的缺血性改变 (图 4A); W-BCCAO 组大鼠海马各区的神经细胞排列整齐致密, 细胞结构完整, 未见明显的形态结构异常 (图 4A)。

大鼠脑白质 (视束) 区域 HE 染色结果可见, S-sham、W-sham 组视束的细胞排列规则, 层次清晰, 无疏松 (图 4A); S-BCCAO 组视束密度明显减少, 出现空泡样病变 (图 4A); W-BCCAO 组可见明显

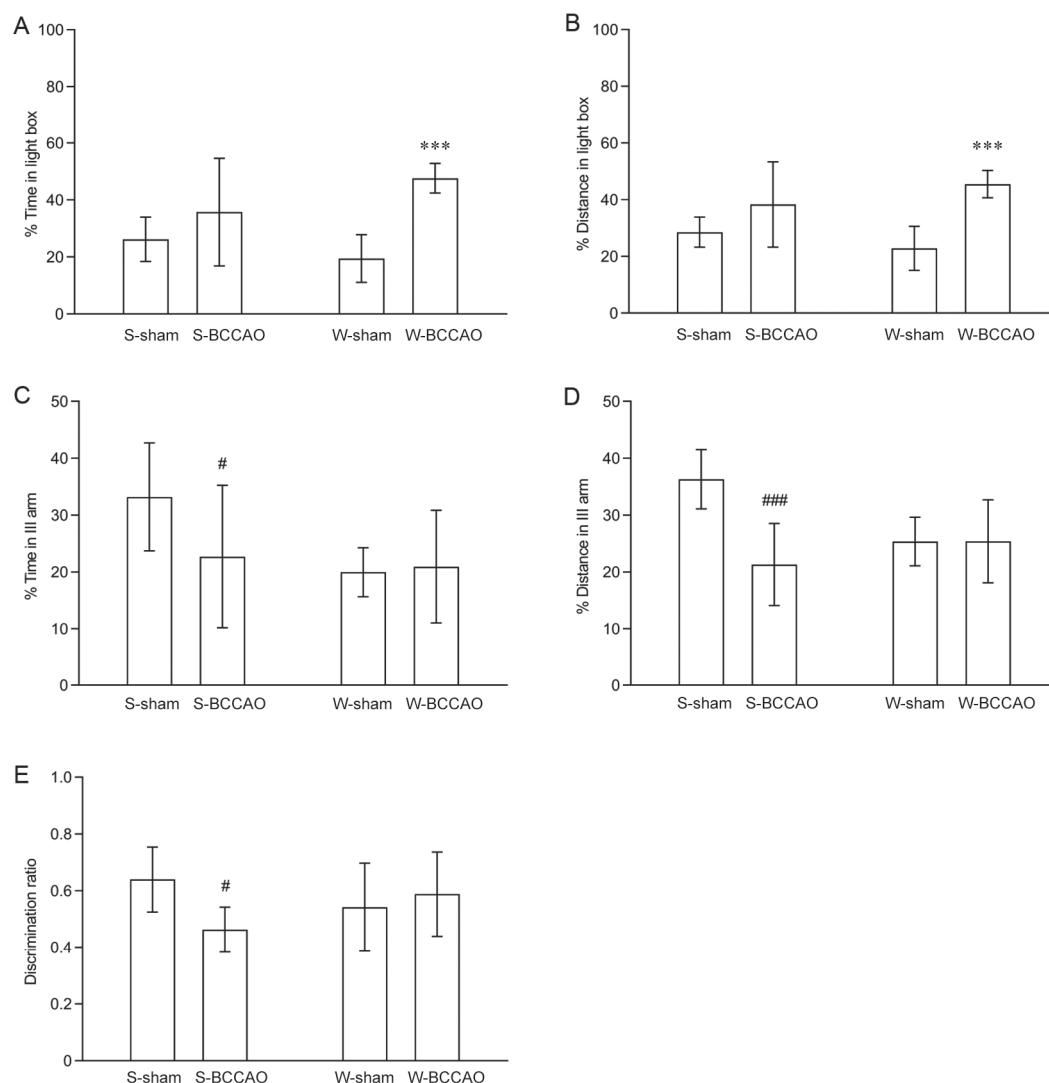


图 3. 双侧颈总动脉结扎(BCCAO)术对SD与Wistar大鼠光线辨识与学习记忆能力的影响

Fig. 3. Effects of bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) on light recognition and learning and memory in SD and Wistar rats. A, B: The average percentage of time spent (A) and distance traveled (B) in the light box of the light-dark box test in 10 min. C, D: The average percentage of time spent (C) and distance traveled (D) in the III arm of the Y-maze test in 8 min. Time spent and distance traveled were evaluated at 28 d using Student's *t* test. The discrimination ratio of the odor recognition task (E) was analyzed using Mann-Whitney U test. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs S-sham group; *** $P < 0.001$ vs W-sham group. Values are expressed as mean $\pm$ SD. $n = 12-15$ per group.

的纤维脱失、白质纤维排列紊乱、空泡形成等白质损伤(图4A)。大鼠白质LFB染色结果显示,S-BCCAO组大鼠视束可见明显空泡样改变(图4A),视束白质损伤评分明显升高,与S-sham组相比具有统计学差异(图4B, $P < 0.001$);W-BCCAO组大鼠视束可见明显空泡样变、脱髓鞘改变以及轴突变性改变(图4A),视束白质损伤评分明显升高,与W-sham组相比具有统计学差异(图4B, $P < 0.001$)。

大鼠视神经矢状面切片HE染色结果显示,

S-sham、W-sham组大鼠视神经纤维束纵行排列、规则有序,其间可见胶质细胞(图4A);S-BCCAO组观察到部分炎性细胞浸润,轻度的神经纤维变性(图4A),视神经损伤评分明显升高,与S-sham组相比具有统计学差异(图4C, $P < 0.01$);W-BCCAO组炎症细胞浸润增多,神经纤维空泡变性呈蜂巢状改变(图4A),视神经损伤评分明显升高,与W-sham组相比具有统计学差异(图4C, $P < 0.01$)。大鼠视神经冠状切面LFB染色结果显示,S-sham、W-sham

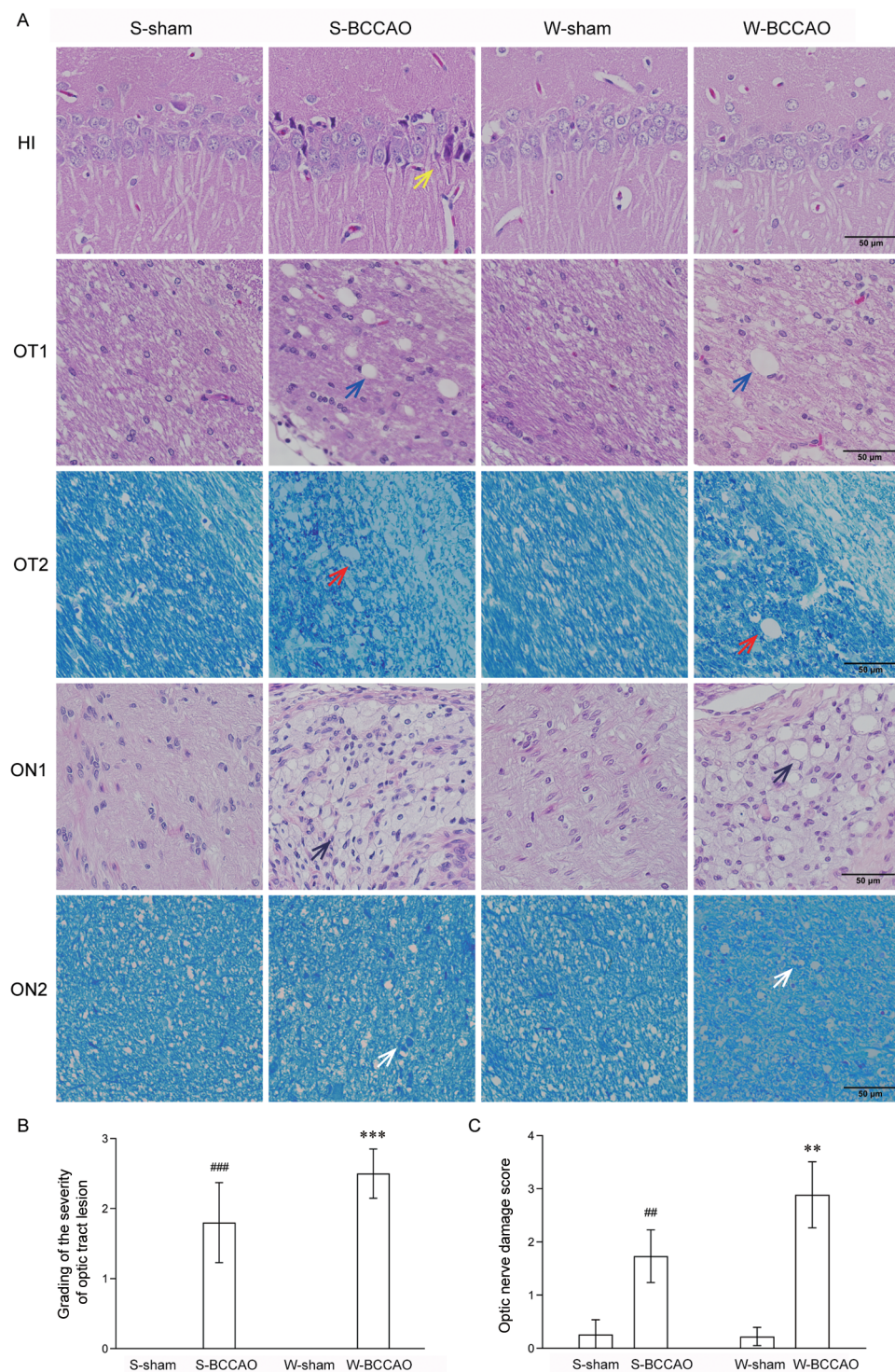


图 4. 双侧颈总动脉结扎(BCCAO)术对SD与Wistar大鼠海马CA1区、视束、视神经的影响

Fig. 4. Effects of bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) on the hippocampal CA1 region, optic tract and optic nerve in SD and Wistar rats detected by HE and LFB staining. *A*: Representative image of the CA1 region of the hippocampus (HI), optic tract stained with HE (OT1), optic tract stained with LFB (OT2), optic nerve stained with HE (ON1), and optic nerve stained with LFB (ON2). HE staining showed most neurons had smaller cell bodies, a disordered arrangement, strongly stained eosinophilic cytoplasm, and irregular triangle-shaped and polygon-shaped nuclei (yellow arrow) in HI. HE staining showed myelin loss and vacuolization (blue arrow) in OT1. Disordered arrangement of nerve fibers was associated with vacuolization and myelin loss (red arrow) in OT2. Severe infiltration (black arrow) was displayed in ON1. Vacuolization and myelin loss (white arrow) were also seen in ON2. Scale bar, 50 μ m. *B*: Histological evaluation score of optic tract stained with LFB. *C*: Histological evaluation score of optic nerve stained with HE. ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ vs S-sham group; ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ vs W-sham group. Values are expressed as mean $\pm$ SD. $n = 6-7$ per group.

组大鼠髓鞘排列整齐, 呈均匀蓝染 (图 4A); S-BC-CAO 组可见髓鞘排列紊乱, 出现髓鞘脱失 (图 4A); W-BCCAO 组可见染色深浅不一, 髓鞘脱失面积较大, 有空泡形成 (图 4A)。

2.6 BCCAO术对大鼠视网膜的影响

视网膜组织病理学检查可见, S-sham 与 W-sham 视网膜各细胞层的层次清晰, 细胞排列整齐, 厚度均匀, HE 染色条件下由内向外可见 7 层 (图 5)。神经节细胞层 (ganglion cell layer, GCL) 细胞边缘清楚, 有 1~2 层细胞核, 较大, 可见核仁, 神经纤维层 (nerve fiber layer, NFL) 主要由神经节细胞轴突组成, 覆盖于 GCL 表面。内网层 (inner plexiform layer, IPL) 较厚, 呈明显网状, 均匀红染。内核层 (inner nuclear layer, INL) 有多层细胞核, 比 GCL 薄。外网层 (outer plexiform layer, OPL) 呈疏松网状, 较 IPL 薄。外核层 (outer nuclear layer, ONL) 排列较 INL 致密,

细胞层次最多且最密集, 核小且深染。感光细胞层 (photoreceptor layer, PL) 呈红色, 细胞排列整齐, 光感受器细胞内外节间见少量间隙。视网膜色素上皮层 (retinal pigment epithelium, RPE) 紧邻脉络膜。

S-BCCAO 组大鼠视网膜总厚度 ($169.5 \mu\text{m} \pm 18.7 \mu\text{m}$) 明显变薄, 与 S-sham 组 ($205.8 \mu\text{m} \pm 18.6 \mu\text{m}$) 相比具有统计学差异 (图 6A, $P < 0.001$), 主要损伤可见于 GCL、IPL 及 OPL 层, 尤其是 OPL 层 (图 5)。OPL 层排列紊乱, 几乎消失, 该层厚度为 (2.2 ± 2.2) μm , 与 S-sham 组 ($12.2 \mu\text{m} \pm 1.3 \mu\text{m}$) 相比具有统计学差异 (图 6E, $P < 0.001$); GCL 层细胞出现空泡变性, RGCs 数量变少, 该层厚度为 (18.6 ± 4.2) μm 、细胞密度 (12.0 ± 4.6) /500 μm , 与 S-sham 组 ($26.1 \mu\text{m} \pm 2.9 \mu\text{m}$, 32.1 ± 2.3 /500 μm) 比较具有统计学差异 (图 6H、I, $P < 0.001$); IPL 层明显变薄, 厚度为 (31.9 ± 9.4) μm , 与 S-sham 组

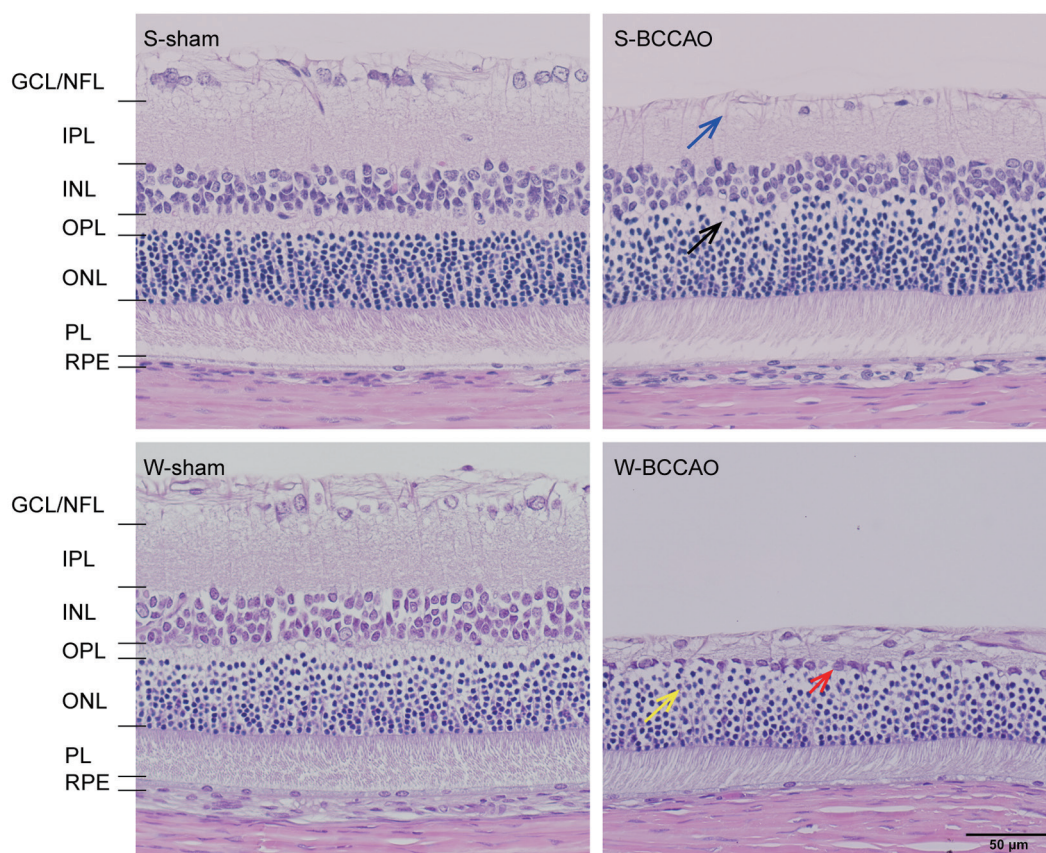


图 5. 双侧颈总动脉结扎(BCCAO)术对SD与Wistar大鼠视网膜的影响

Fig. 5. Effects of bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) on retina in SD and Wistar rats detected by HE staining. Compared with S-sham group, S-BCCAO group showed vacuolation (blue arrow) in ganglion cell layer (GCL) and disordered cells in outer nuclear layer (ONL, black arrow). Compared with W-sham group, W-BCCAO group showed degenerated and/or disappeared (red arrow) cells in inner nuclear layer (INL) and disordered cells (yellow arrow) in ONL. Scale bar, 50 μm . NFL, nerve fiber layer; IPL, inner plexiform layer; OPL, outer plexiform layer; PL, photoreceptor layer; RPE, retinal pigment epithelium.

($49.6 \mu\text{m} \pm 6.4 \mu\text{m}$) 相比具有统计学差异 (图 6G, $P < 0.001$); 其余各层细胞厚度与 S-sham 组相比无显著差异 (图 6B、C、D、F)。

W-BCCAO 组大鼠的视网膜损伤严重, 视网膜总厚度 ($103.4 \mu\text{m} \pm 9.2 \mu\text{m}$) 明显变薄, 与 W-sham 组 ($193.3 \mu\text{m} \pm 7.8 \mu\text{m}$) 相比具有统计学差异 (图 6A, $P < 0.001$)。主要损伤可见于 GCL、IPL、INL、OPL、PL 及 RPE 层, 尤其是 INL 与 OPL 层 (图 5), 光镜下几乎观察不到该细胞层, 厚度分别为 (7.9 ± 2.6) μm 、 $0 \mu\text{m}$, 与对照组 ($31.5 \mu\text{m} \pm 3.4 \mu\text{m}$, $9.8 \mu\text{m} \pm 1.2 \mu\text{m}$) 相比具有统计学差异 (图 6F、E, $P < 0.001$)。ONL 层细胞排列疏松, 但厚度无明显改变; IPL 厚度 ($7.2 \mu\text{m} \pm 4.5 \mu\text{m}$) 明显变薄, 与 W-sham 组 ($42.6 \mu\text{m} \pm 1.9 \mu\text{m}$) 相比具有统计学差异 (图 6G, $P < 0.001$), GCL 层可见大量 RGCs 空泡变性、细胞丢失, 少量残存的 RGCs 核深染且散在分布, 该层厚度为 (10.3 ± 3.6) μm , 细胞密度为 (2.0 ± 1.9)/ $500 \mu\text{m}$, 与 W-sham 组 ($25.5 \mu\text{m} \pm 5.1 \mu\text{m}$, $30.4 \pm 3.5/500 \mu\text{m}$) 相比具有统计学差异 (图 6H、I, $P < 0.001$); PL 厚度 ($30.7 \mu\text{m} \pm 3.8 \mu\text{m}$) 变薄, 与 W-sham 组 ($37.5 \mu\text{m} \pm 3.8 \mu\text{m}$) 相比具有统计学差异 (图 6C, $P < 0.001$), RPE 厚度 ($4.5 \mu\text{m} \pm 0.5 \mu\text{m}$) 变薄, 与 W-sham 组 ($5.4 \mu\text{m} \pm 0.8 \mu\text{m}$) 相比具有统计学差异 (图 6B, $P < 0.01$)。

3 讨论

本研究结果显示, SD 与 Wistar 大鼠的术后生存率差异较大, BCCAO 后 SD 大鼠存活率为 100%, Wistar 大鼠存活率为 62.5%。文献报道, Wistar 大鼠 BCCAO 后死亡率为 13.7%~71%^[8, 24-26]; SD 大鼠的术后死亡率为 7%~40%^[27, 28], 相对而言, SD 大鼠死亡率较低。两个品系大鼠出现不同的术后生存率, 可能缘于解剖结构上的差异, SD 大鼠脑血管具有更加丰富的侧支循环网络, 血管腔径更大, 血管远端变异性和可塑性较高, 而 Wistar 大鼠脑血管则缺乏这种丰富的侧支循环网络、并且血管腔径较小, 使之更容易受到损伤^[29, 30]。此外, Wistar 大鼠 BCCAO 后死亡率的变异率较大, 可能是因为 Wistar 大鼠作为一远交系种系, 来自不同的种群, 而不同厂商差异化的繁育方法诱发基因变异差异, 进而导致其在生理生化指标、神经行为学表现上的差异^[31-33]。

本研究的组织病理学结果显示, Wistar 大鼠 BCCAO 后视束、视神经及视网膜光感受器细胞等

视觉信号传递通路严重受损。PLR 及明暗箱检查结果在行为学上进一步证明, 大鼠视觉系统明显受损。PLR 是由视网膜上的感光细胞 (视锥细胞、视杆细胞) 在感受到光刺激后将光信号转变成视觉信号, 经双极细胞传递给 RGCs, 通过 RGCs 在视神经盘将视觉信号传递给视神经, 再经过视交叉、双侧视束传至中枢神经, 经过处理后由动眼神经将冲动传递给睫状神经节, 而睫状神经支配瞳孔括约肌, 可引起瞳孔直径的改变^[34]。视觉传导通路上的任何一处发生损伤, 均会在一定程度上影响 PLR 的产生与反应程度^[35]。明暗箱通常应用于焦虑行为的检测^[36], 但当大鼠视觉受损, 会导致辨识明亮与黑暗能力减弱或消失。故可通过分析大鼠在明箱与暗箱中的活动时间、活动距离, 来检测大鼠的光线辨识能力的改变^[37]。与 Wistar 大鼠相比, SD 大鼠在 BCCAO 后视觉系统损伤较轻, 可能是其明暗箱检测指标无明显变化的原因。研究表明, 脑白质比灰质更易遭受局部缺血损伤, 主要原因是脑白质的血供多来源于终末动脉, 其特点是垂直的短分支灌注白质, 吻合支少, 侧支循环少, 血管的调节能力弱^[38]; Wistar 大鼠由于血管解剖学特点, 白质更容易遭受慢性脑灌注不足而引起损伤^[20, 29], 其中以视束为最, 胼胝体和内囊次之^[10]; 慢性缺血条件下视束、视神经及视网膜出现严重组织病理学变化, 主要因为其血供直接来自于颈内动脉^[9, 39]。本研究结果表明, BCCAO 均可致两个品系的大鼠视觉功能障碍, 但 SD 大鼠的视束、视神经及视网膜病变较 Wistar 大鼠为轻, 这可能与品系差异相关。因此, 在大鼠 BCCAO 后的行为学评价中, 要充分考虑视觉损伤对行为评价的影响, 因为大多数的行为学检测手段都是以视觉指引为基础, 例如 Morris 水迷宫、位置偏爱实验、高架十字迷宫等, 尤其是 Morris 水迷宫, 是一种标准的以视觉为基础的探索大鼠空间学习记忆能力的实验, 大鼠根据迷宫周围多种视觉参照物来学习并且寻找到放置于水平面下的看不见、听不到、闻不着的隐蔽平台^[10, 40-42]。

之前大多研究认为, BCCAO 后慢性脑血流低灌注导致灰质 (海马), 尤其 CA1 区损伤, 从而影响学习记忆功能^[14]。鉴于 BCCAO 导致大鼠视觉系统损伤, 本研究未选用主要依赖视觉的 Morris 水迷宫, 而选用 Y 迷宫及新气味识别实验进行学习记忆功能检测。本研究结果显示, SD 大鼠学习记忆功能受损且 CA1 区发生缺血性改变, 提示 Y 迷宫及新气味识

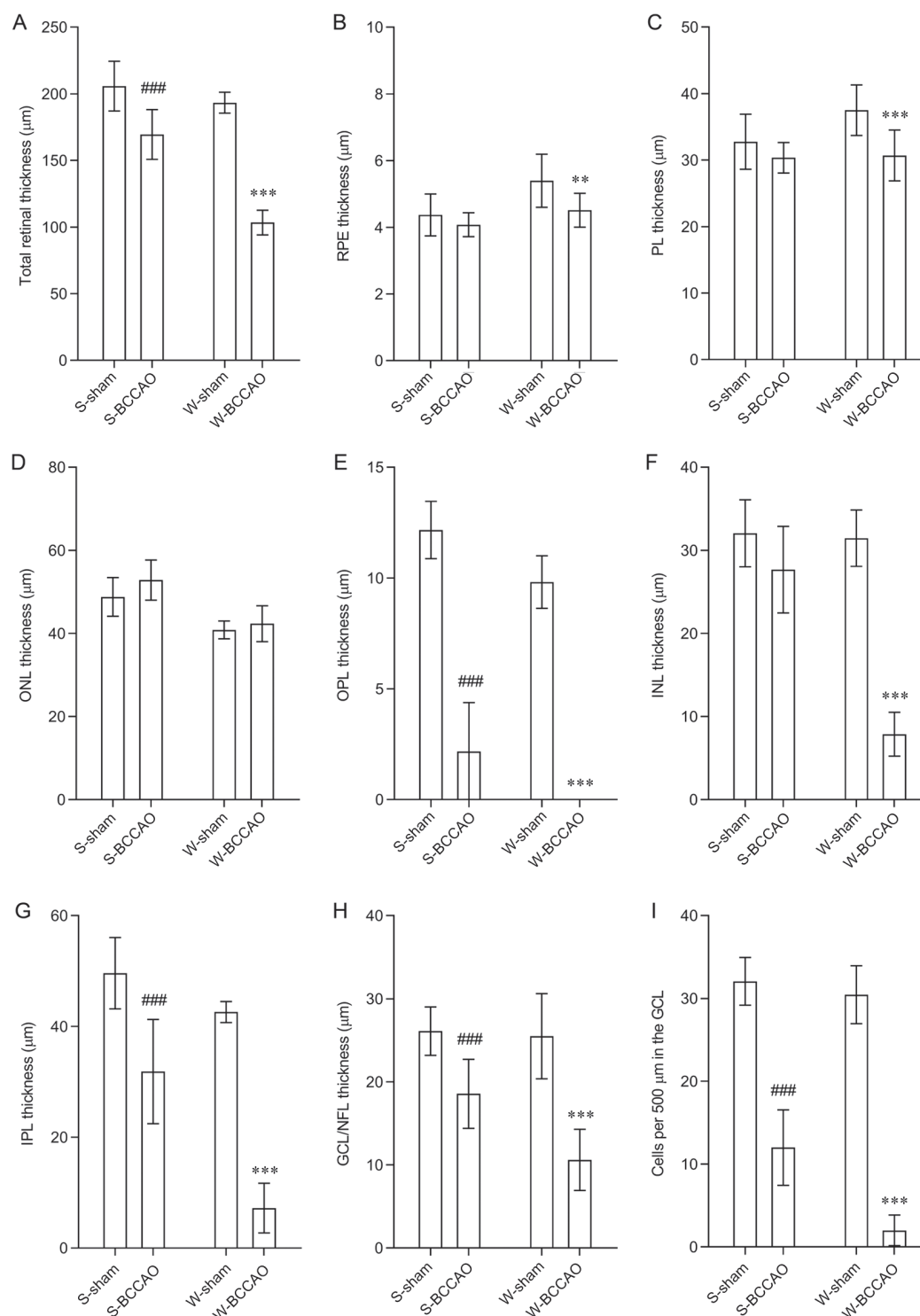


图 6. 双侧颈总动脉结扎(BCCAO)术对SD与Wistar大鼠视网膜、各细胞层厚度及视网膜神经节细胞(RGCs)密度的影响

Fig. 6. Effects of bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) on total retinal thickness, layer thickness and retinal ganglion cells (RGCs) density in SD and Wistar rats. *A*: Thickness of the total retina; *B*: Layer thickness of retinal pigment epithelium (RPE) of the retina; *C*: Layer thickness of photoreceptor layer (PL) of the retina; *D*: Layer thickness of outer nuclear layer (ONL) of the retina; *E*: Layer thickness of outer plexiform layer (OPL) of the retina; *F*: Layer thickness of inner nuclear layer (INL) of the retina; *G*: Layer thickness of inner plexiform layer (IPL) of the retina; *H*: Layer thickness of ganglion cell layer (GCL)/nerve fiber layer (NFL) of the retina; *I*: The mean cell number per 500 μm in the GCL was quantitatively analyzed. The thickness and mean cell number were analyzed by using Student's *t* test. ### $P < 0.001$ vs S-sham group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs W-sham group. Values are expressed as mean $\pm$ SD. $n = 6-7$ per group.

别实验所示的学习记忆障碍可能与海马 CA1 区受损相关。此外, 大多研究亦表明 SD 大鼠 BCCAO 后海马 CA1 区受损^[12-14]。与 SD 大鼠不同, Wistar 大鼠在 Y 迷宫检测中没有表现出明显的学习记忆损伤, 海马亦未出现缺血性改变; 先前研究亦显示, Wistar 大鼠 BCCAO 后无明显海马损伤^[9-11, 43]。以上研究均表明, Wistar 与 SD 大鼠在 BCCAO 后海马病理改变存在差异。

综上所述, 本研究结果显示, Wistar 与 SD 大鼠在 BCCAO 后死亡率、PLR 消失率以及灰质 (海马)、白质 (视束)、视神经和视网膜的损伤并不相同。根据上述差异, 我们认为在研究海马损伤所致的 VaD 时, 应该选择 SD 大鼠而非 Wistar 大鼠, Wistar 大鼠更适用于缺血性视网膜损伤及保护作用的研究。此外, BCCAO 作为常用的 VaD 造模方法, 由于其存在视觉系统损伤, 应该尽量避免使用以视觉为基础的行为学检测方法来评价 BCCAO 动物的认知功能障碍。

参考文献

- Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C, Fox N, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Larson EB, Ritchie K, Rockwood K, Sampson EL, Samus Q, Schneider LS, Selbaek G, Teri L, Mukadam N. Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet* 2017; 390(10113): 2673–2734.
- Xiang J, Pan J, Chen F, Zheng L, Chen Y, Zhang S, Feng W. L-3-n-butylphthalide improves cognitive impairment of APP/PS1 mice by BDNF/TrkB/PI3K/AKT pathway. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7(7): 1706–1713.
- Schreiber SJ, Doepp F, Spruth E, Kopp UA, Valdeuzia JM. Ultrasonographic measurement of cerebral blood flow, cerebral circulation time and cerebral blood volume in vascular and Alzheimer's dementia. *J Neurol* 2005; 252(10): 1171–1177.
- Firbank MJ, He J, Blamire AM, Singh B, Danson P, Kalaria RN, O'Brien JT. Cerebral blood flow by arterial spin labeling in poststroke dementia. *Neurology* 2011; 76(17): 1478–1484.
- Clark LR, Nation DA, Wierenga CE, Bangen KJ, Dev SI, Shin DD, Delano-Wood L, Liu TT, Rissman RA, Bondi MW. Elevated cerebrovascular resistance index is associated with cognitive dysfunction in the very-old. *Alzheimers Res Ther* 2015; 7(1): 3.
- Farkas E, Luiten PGM, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 2007; 54(1): 162–180.
- Eklof B, Siesjö BK. The effect of bilateral carotid artery ligation upon acid-base parameters and substrate levels in the rat brain. *Acta physiol Scand* 1972; 86(4): 528–538.
- Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, Kimura J, Akiguchi I. Glial activation and white matter changes in the rat brain induced by chronic cerebral hypoperfusion: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* 1994; 87(5): 484–492.
- Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, Matsuo A, Lin JX, Ihara M, McGeer PL. Axonal damage and demyelination in the white matter after chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res* 2002; 924(1): 63–70.
- Tian XS, Guo XJ, Ruan Z, Lei Y, Chen YT, Zhang HY. 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. *PLoS One* 2014; 9(6): e101120.
- Guo XJ, Tian XS, Ruan Z, Chen YT, Wu L, Gong Q, Wang W, Zhang HY. Dysregulation of neurotrophic and inflammatory systems accompanied by decreased CREB signaling in ischemic rat retina. *Exp Eye Res* 2014; 125: 156–163.
- de la Torre JC, Cada A, Nelson N, Davis G, Sutherland RJ, Gonzalez-Lima F. Reduced cytochrome oxidase and memory dysfunction after chronic brain ischemia in aged rats. *Neurosci Lett* 1997; 223(3): 165–168.
- Jia H, Zhang XM, Zhang BA, Liu Y, Li JM. Dendritic morphology of neurons in medial prefrontal cortex and hippocampus in 2VO rats. *Neurol Sci* 2012; 33(5): 1063–1070.
- Pappas BA, de la Torre JC, Davidson CM, Keyes MT, Fortin T. 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.
- Stevens WD, Fortin T, Pappas BA. Retinal and optic nerve degeneration after chronic carotid ligation - Time course and role of light exposure. *Stroke* 2002; 33(4): 1107–1112.
- Manella LC, Alperin S, Linster C. Stressors impair odor recognition memory via an olfactory bulb-dependent noradrenergic mechanism. *Front Integr Neurosci* 2013; 7: 97.
- Hackett C, Choi C, O'Brien B, Shin P, Linster C. Odor memory and discrimination covary as a function of delay between encoding and recall in rats. *Chem Senses* 2015; 40(5): 315–323.
- Horstmann L, Schmid H, Heinen AP, Kurschus FC, Dick HB, Joachim SC. Inflammatory demyelination induces glia alterations and ganglion cell loss in the retina of an experimental autoimmune encephalomyelitis model. *Neuroinflammation* 2013; 10: 120.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, 1986.

- notes. 6th Ed. Elsevier Science, 2007.
- 20 Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, Kimura J, Akiguchi I. Protective effect of cyclosporine A on white matter changes in the rat brain after chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 1995; 26(8): 1415–1422.
- 21 Ni Y, Xu G, Hu W, Shi L, Qin Y, Da C. Neuroprotective effects of naloxone against light-induced photoreceptor degeneration through inhibiting retinal microglial activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(6): 2589–2598.
- 22 You Y, Gupta VK, Li JC, Al-Adawy N, Klistorner A, Graham SL. FTY720 protects retinal ganglion cells in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(5): 3060–3066.
- 23 Dellu F, Contarino A, Simon H, Koob GF, Gold LH. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem* 2000; 73(1): 31–48.
- 24 Ni JW, Ohta H, Matsumoto K, Watanabe H, Akiguchi I. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res* 1994; 653(1–2): 231–236.
- 25 Karpiak SE, Tagliavia A, Wakade CG. Animal models for the study of drugs in ischemic stroke. *Annu Rev Pharmacol* 1989; 29: 403–414.
- 26 Farkas E, Timmer NM, Domoki F, Mihaly A, Luiten P, Bari F. Post-ischemic administration of diazoxide attenuates long-term microglial activation in the rat brain after permanent carotid artery occlusion. *Neurosci Lett* 2005; 387(3): 168–172.
- 27 Li N, Gu Z, Li Y, Fu X, Wang J, Bai H. A modified bilateral carotid artery stenosis procedure to develop a chronic cerebral hypoperfusion rat model with an increased survival rate. *J Neurosci Methods* 2015; 255: 115–121.
- 28 Sopala M, Danysz W. Chronic cerebral hypoperfusion in the rat enhances age-related deficits in spatial memory. *J Neural Transm (Vienna)* 2001; 108(12): 1445–1456.
- 29 Howells DW, Porritt MJ, Rewell SSJ, O'Collins V, Sena ES, van der Worp HB, Traystman RJ, Macleod MR. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30(8): 1412–1431.
- 30 Kim S, Cho K, Kim SY. The plasticity of posterior communicating artery influences on the outcome of white matter injury induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Neurol Res* 2009; 31(3): 245–250.
- 31 Pare WP, Kluczynski J. Differences in the stress response of Wistar-Kyoto (WKY) rats from different vendors. *Physiol Behav* 1997; 62(3): 643–648.
- 32 Robertson A, Campbell C, Milner PM, Laferriere A. Rat strain differences in the acquisition of hippocampal self-stimulation. *Brain Res Bull* 1986; 16(3): 369–375.
- 33 Portelli J, Aourz N, De Bundel D, Meurs A, Smolders I, Michotte Y, Clinckers R. Intrastrain differences in seizure susceptibility, pharmacological response and basal neurochemistry of Wistar rats. *Epilepsy Res* 2009; 87(2–3): 234–246.
- 34 Felten DL, Netter FH, O'Banion MK, Maida MS. Netter's Atlas of Neuroscience. Elsevier, 2015.
- 35 Hall CA, Chilcott RP. Eyeing up the future of the pupillary light reflex in neurodiagnostics. *Diagnostics (Basel)* 2018; 8(1): pii: E19.
- 36 Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 32(3): 777–785.
- 37 Wang Y, Yin Z, Gao L, Sun D, Hu X, Xue L, Dai J, Zeng Y, Chen S, Pan B, Chen M, Xie J, Xu H. Curcumin delays retinal degeneration by regulating microglia activation in the retina of rd1 mice. *Cell Physiol Biochem* 2017; 44(2): 479–493.
- 38 Wang Y, Liu G, Hong D, Chen F, Ji X, Cao G. White matter injury in ischemic stroke. *Prog Neurobiol* 2016; 141: 45–60.
- 39 Minhas G, Morishita R, Anand A. Preclinical models to investigate retinal ischemia: advances and drawbacks. *Front Neurol* 2012; 3: 75.
- 40 Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297(5868): 681–683.
- 41 Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Neurosci Methods* 1984; 11(1): 47–60.
- 42 Morris RG. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 1981; 12(2): 239–260.
- 43 Kitamura A, Fujita Y, Oishi N, Kalaria RN, Washida K, Maki T, Okamoto Y, Hase Y, Yamada M, Takahashi J, Ito H, Tomimoto H, Fukuyama H, Takahashi R, Ihara M. Selective white matter abnormalities in a novel rat model of vascular dementia. *Neurobiol Aging* 2012; 33(5): 1012.e25–e35.