

蛛网膜下隙出血模型脑内微栓子形成的实验研究

佟怀宇 许百男

【摘要】 目的 探讨蛛网膜下隙出血后迟发性脑缺血的发生机制,以期寻求新的治疗方法,提高蛛网膜下隙出血后脑缺血防治水平。**方法** 采用经颈动脉尼龙线颅内动脉刺破法建立小鼠蛛网膜下隙出血模型,通过大体标本和组织切片证实为蛛网膜下隙出血。免疫组织化学荧光染色法确认脑内微栓子形成,计数不同处理组动物平均微栓子数目(微栓子负载)。**结果** 微栓子呈簇状,散在分布于两侧大脑半球,无侧别差异。微栓子数目,假出血组 0.00(0.00, 0.05) 个/mm²,蛛网膜下隙出血 24 h 组 0.29(0.11, 0.46) 个/mm²、48 h 组 2.30(1.24, 3.87) 个/mm²、72 h 组 1.47(0.70, 2.67) 个/mm²,假出血组与蛛网膜下隙出血组不同观察时间点(组)比较,微栓子数目差异有统计学意义(均 $P = 0.000$);蛛网膜下隙出血组不同观察时间点(组)之间,微栓子计数差异亦有统计学意义(均 $P = 0.000$)。**结论** 蛛网膜下隙出血后脑血管内形成的、广泛分布的大量微栓子可能参与了迟发性脑缺血的发生机制,微栓子负载时程呈现血栓形成与溶解的动态变化过程。

【关键词】 蛛网膜下腔出血; 脑动脉; 血栓形成; 疾病模型,动物

DOI: 10.3969/j.issn.1672-6731.2010.03.017

Experimental study on intracerebral microembolic distribution in subarachnoid hemorrhage model TONG Huai-yu, XU Bai-nan. Department of Neurosurgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Corresponding author: XU Bai-nan (Email: bnx100@hotmail.com)

【Abstract】 **Objective** To explore the mechanism of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage (SAH), in order to find out new therapy to improve the prevention and treatment of cerebral ischemia after SAH. **Methods** SAH model was established by trans-carotid puncture of intracranial artery with nylon suture. The experimental mice were divided into sham group ($n = 5$) and 24 h, 48 h, 72 h after SAH groups, namely 24 h group ($n = 4$), 48 h group ($n = 6$) and 72 h group ($n = 8$). SAH was diagnosed by gross specimen and histological examination but not by the presentation of intracerebral hemorrhage. Intracerebral microemboli were identified by immunohistochemical fluorescent. The mean number of microemboli per mm² (microemboli burden) was calculated and compared in different groups. **Results** Microemboli appeared in cluster, and were scattered equally throughout both hemispheres. The number of microemboli were 0.00 (0.00, 0.05)/mm² in sham group, 0.29 (0.11, 0.46)/mm² in 24 h group, 2.30 (1.24, 3.87)/mm² in 48 h group and 1.47 (0.70, 2.67)/mm² in 72 h group. The microemboli burden in sham group was significantly different with groups after SAH at every observation time ($P = 0.000$, for all). Among the groups after SAH, the differences of microemboli burden were all significant at different observation times ($P = 0.000$, for all). **Conclusion** The extensive distribution of microemboli after SAH in both hemispheres may contribute to delayed cerebral ischemia. The time course of microemboli burden presents the dynamic course of microembolic formation and dissolution.

【Key words】 Subarachnoid hemorrhage; Cerebral arteries; Thrombosis; Disease models, animal

颅内动脉瘤破裂蛛网膜下隙出血(SAH)患者有 30%~40% 发生迟发性脑缺血。自 20 世纪 40 年代始,脑血管痉挛即被认为是蛛网膜下隙出血后导致脑缺血的主要原因^[1,2];之后依据脑出血后血管痉挛

发生的时间,将其分为早期血管痉挛和迟发性血管痉挛^[3,4]。随后的数十年中,预防与纠正脑血管痉挛即成为防止蛛网膜下隙出血后继发脑缺血的中心任务。然而,近年有关脑血管痉挛与临床脑缺血表现之间的必然联系遭到质疑,其原因是:脑血管痉挛与缺血灶部位及病情严重程度之间存在明显差异^[5-7];病理学和神经影像学所发现的散在多发性小

作者单位:100853 北京,解放军总医院神经外科
通信作者:许百男(Email: bnx100@hotmail.com)

缺血灶无法用大血管痉挛来解释^[8-10];预防和减轻大血管痉挛对减少缺血灶无益;大量应用抗血管痉挛药物,迟发性脑缺血仍然发生^[11]。颅脑创伤后微栓子形成是导致脑组织缺血的重要原因,据此推测,微栓子形成有可能是导致蛛网膜下隙出血后脑缺血的原因之一。为此,我们通过文献检索和实验观察建立了小鼠经颈动脉尼龙线刺破颅内动脉法蛛网膜下隙出血模型,以证实上述假设。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物 清洁级 C57BL/6 小鼠 30 只,雌雄不限;鼠龄 60~70 d,平均(65.20±2.88) d;体质量 20~25 g,平均(23.63±1.27) g。由解放军总医院实验动物中心提供并饲养,室温维持在 18~22℃,湿度 40%~50%,笼养、自由进食水。

2. 主要试剂与药品 体积分数为 70%、80%、95%和 100%乙醇各 180 ml,由 1000 ml 无水乙醇配制,磷酸盐缓冲液 1000 ml,体积分数为 30%过氧化氢 250 ml,以及甲醇 500 ml 均购自北京时代化学试剂厂。正常马血清由北京亚平宁生物科技发展有限公司提供。免疫试剂中 I 抗为绵羊多克隆抗凝血酶 III 抗体(美国 ADI 公司),工作浓度为 1:300,II 抗为瓶装粉末状荧光素标记的兔抗羊 IgG 抗体(美国 Invitrogen 公司),工作浓度为 1:400,购自北京亚平宁生物科技发展有限公司。

二、实验方法

1. 蛛网膜下隙出血动物模型的建立及分组

(1)动物模型制备:参照文献[12]方法,苯巴比妥钠(65 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠,电热灯维持体温于(37.00±0.50)℃。小鼠仰卧位,纸质胶布固定四肢,中线切口显露右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,结扎并切断颈外动脉,经颈外动脉残端插入经研磨带尖 5-0 尼龙线,经颈动脉分叉部、颈内动脉进入颅内,到达颈内动脉之大脑前动脉及大脑中动脉分叉部,遇阻力后继续向前 3 mm,刺破大脑前动脉,然后迅速取出尼龙线,结扎颈外动脉;保证血液再灌注造成蛛网膜下隙出血。假出血组尼龙线仅送至颈动脉分叉部,不产生蛛网膜下隙出血。缝合皮肤,观察至小鼠恢复反射。手术后皮下注射体积分数为 10%的右旋糖酐加生理盐水 0.50 ml,2 次/d,补充营养同时防止脱水。(2)实验分组:30 只实验小鼠分为蛛网膜下隙出血组(SAH 组,25 只)和假出血

组(5 只),再根据手术后动物处死时间将蛛网膜下隙出血组小鼠又分为出血后 24、48 和 72 h 共 3 个亚组。模型制备成功者计 23 只,其中假出血组 5 只,蛛网膜下隙出血组 18 只(24 h 组 4 只、48 h 组 6 只和 72 h 组 8 只),进行分析。7 只失败动物中 4 只未达到预期的蛛网膜下隙出血,3 只实验观察过程中死亡。(3)结果评定:分别于蛛网膜下隙出血后 24、48 和 72 h 处死小鼠,大体标本腹侧面照相证实蛛网膜下隙出血,组织病理学观察证实为蛛网膜下隙出血且无脑内出血者,视为实验成功。

2. 脑内微栓子的组织病理学观察及评价

(1)HE 染色:分别于制模手术后 24、48 和 72 h 处死蛛网膜下隙出血组小鼠,假出血组小鼠于假手术后 72 h 处死。过量苯巴比妥钠(200 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠,肝素化生理盐水和质量分数为 4%多聚甲醛溶液经左心室灌注,断头取全脑,质量分数为 4%多聚甲醛溶液 4℃固定过夜,0.20 mol/L、pH 值 7.40 磷酸盐缓冲液 4℃放置 3 d,体积分数为 30%蔗糖溶液浸泡 4~5 d 直至饱和。异戊醛包埋、-30~-40℃冰冻脑组织标本,自额极后方 3 mm 至小脑连续冠状切片,层厚 20 μm,HE 染色,确认出血仅局限于蛛网膜下隙而皮质表面未被穿透。(2)免疫组织化学染色:血管内微栓子组织切片经顺序乙醇复水、体积分数为 30%过氧化氢和甲醇混合液预处理,体积分数为 2%马血清封闭,绵羊多克隆抗体(I 抗,1:300)孵育过夜,兔抗羊 IgG 荧光抗体(II 抗,1:400)孵育,免疫荧光染色识别游离抗凝血酶 III 抗体和抗凝血酶 III-蛋白酶复合物中的抗凝血酶 III 抗体。(3)血管内微栓子评价:应用 MCID 影像软件(英国 Cambridge 公司),随机选择每张组织切片中的 5 个视野(×20),计数每一视野内微栓子数目,并测量每一视野表面积,计算每一张脑组织切片 5 个视野内的微栓子平均数目作为切片微栓子数目。每只小鼠平均计数约 50 张组织切片,计算该小鼠的平均微栓子数目,再分别计算不同处理组小鼠平均微栓子数目(即微栓子负载);然后分别比较不同观察时间点蛛网膜下隙出血组和假出血组小鼠微栓子负载情况。

三、统计分析方法

采用 SPSS 11.5 软件进行数据处理。计量资料以中位数(四分位数间距)表示,将每只小鼠单个切面单个视野的微栓子数目作为单一变量计数,不同处理组样本间的比较采用非参数 Kruskal-Wallis 检

验(H 检验),并进一步行两两比较。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

蛛网膜下隙出血组小鼠存在不同程度的蛛网膜下隙出血,典型表现为腹侧脑沟内有大小不等的血凝块;随着出血时间的延长,蛛网膜下隙中的血凝块逐渐减少。组织病理学观察显示,急性蛛网膜下隙出血时,蛛网膜下隙中有大量红细胞,且大量炎性细胞浸润并累及出血邻近脑组织(图1),并于 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ 管径的动脉、微动脉和静脉、微静脉中可见微栓子形成(图2)。

表1,2显示,与假出血组比较,蛛网膜下隙出血各亚组(24、48和72 h)微栓子数目差异均有统计学意义($P = 0.000$);48 h组微栓子数目分别多于24 h组和72 h组,且差异有统计学意义(均 $P = 0.000$)。不同处理组微栓子负载程度评价显示,假出血组小鼠脑组织内几乎未见微栓子形成;发生蛛网膜下隙出血后,微栓子密度迅速增加,并于48 h达峰值水平,且高于其他各亚组(均 $P = 0.000$),之后逐渐减少。说明,蛛网膜下隙出血可以诱发下级血管内的微栓子形成,参与脑缺血过程,而微栓子形成的高峰期为出血后48 h,提示干预的时间窗可能为出血后48 h内。微栓子多呈簇状,散在分布于两侧的大脑半球,个体间无侧别差异。

由于各组方差不齐,故采用非参数Kruskal-Wallis检验进行多个独立样本间的比较,不同组间差异具有统计学意义($\chi^2 = 788.991, P = 0.000$),进一步两两比较,差异均有统计学意义($P = 0.000$)。

讨 论

本实验结果证实,蛛网膜下隙出血后脑血管内可形成广泛分布的微栓子,提示,蛛网膜下隙出血可以诱发下级血管内的微栓子形成,参与脑缺血过程。蛛网膜下隙出血诱发微栓子形成的病理学机制,可能与以下原因有关:(1)脑内小动脉暴露于蛛网膜下隙出血环境下,其外膜表面的组织凝血酶(组织因子)在体内浓度最高,激活后启动内源性凝血过程^[13],足量的组织因子激活,导致局灶性弥漫性血管内凝血(DIC)^[14]。(2)蛛网膜下隙出血可同时激活血管内皮细胞,通过血管损伤而影响大血管结构^[15],从而形成血小板凝血激活和微栓子形成的内环境。采用特殊染色方法业已证实血小板聚集^[16]和微栓子形成^[12],经颅多普勒(TCD)超声也可见大量微栓子在脑血管内活动^[17]。有研究显示,MRI所见的散在性小梗死灶不但与预期的脑血管痉挛大片梗死分布区域不符,而且与动脉瘤及脑血管痉挛的位置无关^[18]。我们认为,局灶性弥漫性血管内凝血是蛛网膜下隙出血后脑内微栓子形成的重要机制,可能参与脑的缺血性损害。值得指出的是,虽

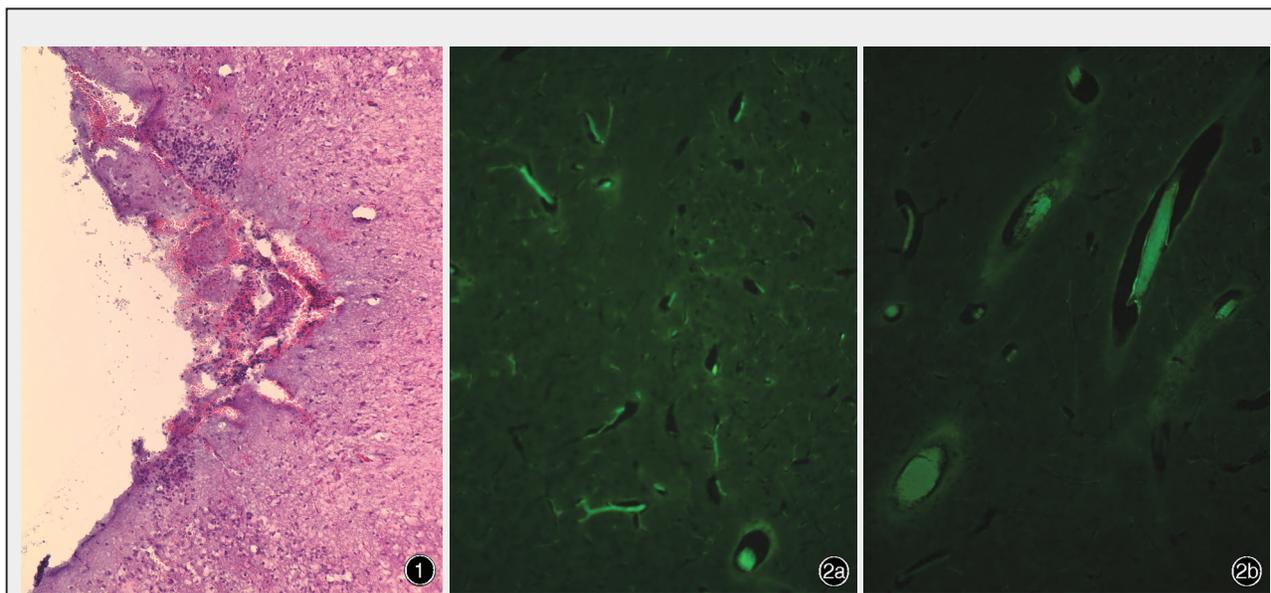


图1 蛛网膜下隙出血后48 h,光学显微镜观察蛛网膜下隙可见大量红细胞 HE染色 $\times 10$ 图2 蛛网膜下隙出血后48 h,荧光显微镜观察可见血管内微栓子形成 免疫荧光染色 $\times 20$ 2a 小的皮质血管 2b 大的穿支动脉和静脉

表 1 不同处理组小鼠微栓子数目(微栓子负载)的比较($\bar{x} \pm s$, 个/mm²)

组别	样本例数	视野数	$P_{50}(P_{25}, P_{75})$	Min	Max
假出血组(1)	5	245	0.00(0.00, 0.05)	0.00	0.07
SAH 组					
24 h 组(2)	4	247	0.29(0.11, 0.46)	0.21	0.48
48 h 组(3)	6	365	2.30(1.24, 3.87)	0.81	6.06
72 h 组(4)	8	416	1.47(0.70, 2.67)	0.32	3.78
χ^2 值	788.991				
P 值	0.000				

表 2 不同处理组小鼠微栓子数目(微栓子负载)的两两比较

组间两两比	Z 值	P 值
(1) : (2)	-15.334	0.000
(1) : (3)	-20.100	0.000
(1) : (4)	-20.964	0.000
(2) : (3)	-17.771	0.000
(2) : (4)	-17.022	0.000
(3) : (4)	-6.062	0.000

然脑血管痉挛无法完全解释蛛网膜下隙出血后的脑缺血变化,但其不良反应仍值得关注。本实验结果支持了我们的推测,血栓栓塞参与蛛网膜下隙出血后的脑缺血过程,可能加重脑血管痉挛的作用。据文献报道,颈动脉支架植入术后形成微栓子时,血流速度低者预后不良^[19]。与脑血管痉挛相似,血栓栓塞在蛛网膜下隙大量出血时较为严重^[20],这两种现象的持续时间相近。蛛网膜下隙出血后微栓子数目随着时间的延长而有所不同,微栓子形成和消散的时程符合我们的假设。此变化过程提示了可能的治疗时间窗。

微栓子负载的时程表现为血栓形成和溶解的动态变化过程,这一过程在颅脑创伤研究中曾有报道^[21]。之所以称之为“微栓子”,而不是“微血栓”,是因为我们推测,此类脑缺血发生的原因源于微栓子脱落后血管阻塞,组织因子机制可能在较大管径动脉内皮损伤表面形成血小板团块或血栓^[13],如果这些血栓体积十分微小,则不会直接在形成部位阻塞动脉,而是成为栓子的来源。已有证据显示,蛛网膜下隙出血包含内皮损伤、黏附分子累积和血小板聚集^[15,16],而TCD检查发现,蛛网膜下隙出血患者的微栓子信号与迟发性脑缺血有关,而与脑血管痉挛无关^[22]。一般认为,血栓栓塞可能与脑血管

痉挛同时作用于蛛网膜下隙出血,二者可能呈协同作用^[23]。Orlandi等^[19]的研究证实,脑血管狭窄和微栓子在颈动脉支架植入术过程中对脑缺血的发生发展具有协同作用,同样的协同效果亦可见于蛛网膜下隙出血患者,即可解释脑血管痉挛治疗效果欠佳的原因。此外,某些对蛛网膜下隙出血后迟发性脑缺血有效的药物,诸如非甾体抗炎药、他汀类药物、钙拮抗剂尼莫地平等均具有抗凝、抗血小板和溶栓作用,其疗效或许是源自药物的抗凝、抗血小板及溶栓作用,而非抗血管痉挛作用^[24]。

在本研究中,我们首次报告了微栓子变化的时程,为临床选择治疗时机提供了一定的理论依据。下一步我们将在该动物模型的基础上,比较脑血管痉挛和血栓栓子在蛛网膜下隙出血后脑缺血过程中的作用,并进一步研究预防和缓解蛛网膜下隙出血后迟发性脑缺血的联合治疗方案。

参 考 文 献

- [1] Echlin FA. Vasospasm and focal cerebral ischemia: an experimental study. Arch Neurol Psychiatry, 1942, 47:77-96.
- [2] Robertson EG. Cerebral lesions due to intracranial aneurysms. Brain, 1949, 72(Pt 2):150-185.
- [3] Bergvall U, Steiner L, Forster DM. Early pattern of cerebral circulatory disturbances following subarachnoid haemorrhage. Neuroradiology, 1973, 5:24-32.
- [4] Kagstrom E, Greitz T, Hanson J. Changes in cerebral blood flow after subarachnoid hemorrhage//Proceedings of the Third International Congress of Neurological Surgery, Amsterdam, Netherlands, 1965. Amsterdam: Excerpta Medica, 1966: 629-633.
- [5] Ohkuma H, Manabe H, Tanaka M, et al. Impact of cerebral microcirculatory changes on cerebral blood flow during cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Stroke, 2000, 31:1621-1627.
- [6] Rabinstein AA, Friedman JA, Weigand SD, et al. Predictors of cerebral infarction in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Stroke, 2004, 35:1862-1866.
- [7] Eichstaedt E, Cordes M, Reyes R, et al. Quantification of regional blood flow with HMPAO - SPECT after subarachnoid bleeding and vasospasm. Can J Neurol Sci, 1993, 20(Suppl):6.
- [8] Dreier JP, Sakowitz OW, Harder A, et al. Focal laminar cortical MR signal abnormalities after subarachnoid hemorrhage. Ann Neurol, 2002, 52:825-829.
- [9] Hertel F, Walter C, Bettag M, et al. Perfusion - weighted magnetic resonance imaging in patients with vasospasm: a useful new tool in the management of patients with subarachnoid hemorrhage. Neurosurgery, 2005, 56:28-35.
- [10] Rabinstein AA, Weigand S, Atkinson JL, et al. Patterns of cerebral infarction in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Stroke, 2005, 36:992-997.
- [11] Harrod CG, Bendok BR, Batjer HH. Prediction of cerebral vasospasm in patients presenting with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a review. Neurosurgery, 2005, 56:633-654.
- [12] Parra A, McGirt MJ, Sheng H, et al. Mouse model of subarachnoid hemorrhage associated cerebral vasospasm:

- methodological analysis. *Neurol Res*, 2002, 24:510-516.
- [13] Day SM, Reeve JL, Pedersen B, et al. Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood*, 2005, 105:192-198.
- [14] Park KW, Metais C, Dai HB, et al. Microvascular endothelial dysfunction and its mechanism in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Anesth Analg*, 2001, 92:990-996.
- [15] Perkins E, Kimura H, Parent AD, et al. Evaluation of the microvasculature and cerebral ischemia after experimental subarachnoid hemorrhage in dogs. *J Neurosurg*, 2002, 97:896-904.
- [16] Sehba FA, Mostafa G, Friedrich V Jr, et al. Acute microvascular platelet aggregation after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 2005, 102:1094-1100.
- [17] Romano JG, Forteza AM, Concha M, et al. Detection of microemboli by transcranial Doppler ultrasonography in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 2002, 50:1026-1030.
- [18] Shimoda M, Takeuchi M, Tominaga J, et al. Asymptomatic versus symptomatic infarcts from vasospasm in patients with subarachnoid hemorrhage: serial magnetic resonance imaging. *Neurosurgery*, 2001, 49:1341-1350.
- [19] Orlandi G, Fanucchi S, Gallerini S, et al. Impaired clearance of microemboli and cerebrovascular symptoms during carotid stenting procedures. *Arch Neurol*, 2005, 62:1208-1211.
- [20] Reilly C, Amidei C, Tolentino J, et al. Clot volume and clearance rate as independent predictors of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 2004, 101:255-261.
- [21] Lu D, Mahmood A, Goussev A, et al. Delayed thrombosis after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*, 2004, 21:1756-1766.
- [22] Romano JG, Rabinstein AA, Arheart KL, et al. Microemboli in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neuroimaging*, 2008, 18:396-401.
- [23] Stein SC, Levine JM, Nagpal S, et al. Vasospasm as the sole cause of cerebral ischemia: how strong is the evidence? *Neurosurg Focus*, 2006, 21:E2.
- [24] Vergouwen MD, Vermeulen M, de Haan RJ, et al. Dihydropyridine calcium antagonists increase fibrinolytic activity: a systematic review. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27:1293-1308.

(收稿日期:2010-03-09)

· 小词典 ·

中英文对照名词词汇(八)

本期出现的其他缩略语

细胞内结构域 intracellular domain(ICD)
 细胞外结构域 extracellular domain(ECD)
 纤维母细胞生长因子 fibroblast growth factor(FGF)
 小干扰 RNA small interference RNA(siRNA)
 兴奋性氨基酸 excitatory amino acid(EAA)
 血管内皮生长因子 vascular endothelial growth factor(VEGF)
 血管内皮细胞 vascular endothelial cells(VECs)
 血凝抑制抗体 hemagglutination inhibition antibodies (HIAb)
 血小板源性生长因子 platelet-derived growth factor(PDGF)
 羊瘙痒病因子 scrapie prion protein(PrP^{Sc})
 一氧化氮合酶 nitric oxide synthase(NOS)
 胰岛素样生长因子-1 insulin-like growth factor-1(IGF-1)
 乙二胺四乙酸 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
 乙酰胆碱受体 acetylcholine receptor(AChR)
 乙酰胆碱受体抗体 acetylcholine receptor antibody(AChRAb)
 乙酰胆碱酯酶 acetylcholinesterase(AChE)
 乙酰胆碱酯酶抑制剂 acetylcholinesterase inhibitors(AChEI)
 N-乙酰天冬氨酸 N-acetyl-aspartate(NAA)
 异硫氰酸荧光素 fluorescein isothiocyanate(FITC)
 游离前列腺特异抗原 free prostate specific antigen(fPSA)
 RNA 诱导沉默复合体 RNA-induced silencing complex(RISC)

PTEN 诱导激酶 1 PTEN induced putative kinase 1(PINK1)
 载脂蛋白 E apolipoprotein E(ApoE)
 藻红蛋白 phycoerythrin(PE)
 增强型绿色荧光蛋白 enhanced green fluorescent protein(EGFP)
 照料者负担 caregiver burden(CB)
 脂多糖 lipopolysaccharides(LPS)
 质量调整寿命年 Quality Adjusted Life Years(QALYs)
 肿瘤坏死因子 tumor necrosis factor(TNF)
 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 TNF-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)
 转化生长因子-β1 transforming growth factor-β1(TGF-β1)

临床试验

加拿大健康与老龄化研究 Canadian Study of Health and Aging(CSHA)
 护士健康研究 Nurses' Health Study(NHS)
 Honolulu-Asia 老龄化研究 Honolulu-Asia Aging Study(HAAS)
 老年人认知与预后研究 Study on Cognition and Prognosis in the Elderly(SCOPE)
 美国 Framingham 心脏研究 Framingham Heart Study(FHS)
 美国性病研究实验室试验 Venereal Disease Research Laboratory(VDRL)
 心血管健康研究 Cardiovascular Health Study(CHHS)
 英国医学研究理事会认知功能与老龄化研究 Medical Research Council Cognitive Function and Aging Study(MRC CFAS)