

大鼠蛛网膜下隙出血脑血管痉挛模型的建立

范议方 韩如泉

【摘要】 目的 采用两种注血方法建立大鼠蛛网膜下隙出血早期脑血管痉挛模型,比较两种制备方法对脑血管痉挛程度的影响。**方法** 分别采用枕大池一次注血和二次注血法制备蛛网膜下隙出血早期基底动脉痉挛动物模型,HE染色观察基底动脉形态变化,计算基底动脉血管横截面积;透射电子显微镜观察基底动脉超微结构变化。**结果** 光学显微镜观察,枕大池一次注血组和二次注血组大鼠颅底有凝血块沉积;一次注血组大鼠基底动脉血管横截面积略有缩小 $[(2.68 \pm 0.48) \times 10^{-2} \text{ mm}^2]$,但与假手术组比较差异无统计学意义($q = 2.630, P = 0.070$),二次注血组大鼠基底动脉血管横截面积 $[(2.41 \pm 0.24) \times 10^{-2} \text{ mm}^2]$ 显著小于假手术组($q = 4.660, P = 0.003$),但与一次注血组之间差异无统计学意义($q = 2.031, P = 0.166$)。电子显微镜观察,一次注血组大鼠基底动脉内弹力层局部变薄,内皮细胞胞质少量空泡形成,胞膜损伤崩解,中膜平滑肌细胞空泡样变性;二次注血组大鼠中膜平滑肌细胞和内皮细胞胞质空泡样变性,内皮细胞胞膜受损。**结论** 经枕大池注血法可复制蛛网膜下隙出血早期脑血管痉挛动物模型,以二次注血法所复制的脑血管痉挛模型更为稳定。

【关键词】 蛛网膜下腔出血; 血管痉挛,颅内; 显微镜检查,电子,透射; 疾病模型,动物

DOI: 10.3969/j.issn.1672-6731.2010.04.016

Two models of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats FAN Yi-fang, HAN Ru-quan. Department of Anesthesiology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Corresponding author: HAN Ru-quan (Email: hanrq666@yahoo.com.cn)

【Abstract】 Objective To establish and compare the early cerebral vasospasm (CVS) caused by 2 subarachnoid hemorrhage (SAH) models. **Methods** Thirty-nine Wistar rats were divided into 3 groups: control group, single injection group and double injection group. Rat subarachnoid hemorrhage was induced by single or double injection of autologous blood into the cisterna magna. A second injection was given after 48 h in double injection group. Perfusion-fixation was performed after 24 h of receiving the last intracisternal injection of blood, and then brain tissue and basilar artery were removed. HE staining was used to examine morphology and cross-sectional areas of the basilar artery. The ultrastructural changes were observed by electron microscope. **Results** There were obvious clots in the basilar region, and decreasing cross-sectional areas in the 2 kinds of injection groups ($F = 5.460, P = 0.012$). Cross-sectional areas of basilar artery in single injection group were slightly decreased $[(2.68 \pm 0.48) \times 10^{-2} \text{ mm}^2]$, and the difference compared with control group was not significant ($q = 2.630, P = 0.070$). Cross-sectional areas of basilar artery in double injection group were significantly decreased compared with control group $[(2.41 \pm 0.24) \times 10^{-2} \text{ mm}^2; q = 4.660, P = 0.003]$, but there was no significant difference with single injection group ($q = 2.031, P = 0.166$). Ultrastructural changes of the artery wall and hippocampus were observed in injection groups, including dystrophy of endotheliocyte, vacuolated cytoplasm, distortion of smooth muscle cell and corrugation of intimal elastic lamina. **Conclusion** Blood injection into the cisterna magna in rats can establish early cerebral vasospasm model after subarachnoid hemorrhage. The double injection group is more stable.

【Key words】 Subarachnoid hemorrhage; Vasospasm, intracranial; Microscopy, electron, transmission; Disease models, animal

蛛网膜下隙出血(SAH)后脑血管痉挛(CVS)为

基金项目:北京市科技新星计划项目(项目编号:2007B074)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京天坛医院麻醉科

通信作者:韩如泉(Email:hanrq666@yahoo.com.cn)

一严重的病理生理状态,根据发生时间可分为急性脑血管痉挛和迟发性脑血管痉挛。目前的研究主要集中于迟发性脑血管痉挛,而对蛛网膜下隙出血后急性脑血管痉挛和早期脑损伤的研究相对匮

乏。我们通过枕大池一次注血和二次注血方法复制蛛网膜下隙出血后急性脑血管痉挛大鼠模型,观察比较疾病早期脑血管的病理变化及血管痉挛程度,以为进一步研究蛛网膜下隙出血后早期脑损伤提供动物模型制备基础。

材料与方 法

一、材料

1. 实验动物与分组 清洁级 8~9 周龄雄性 Wistar 大鼠 39 只,体质量 280~330 g,平均(307.26±13.10) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[许可证号:SCXK(京)2006-0009],饲养室恒温 22℃,标准鼠料饲养,自由进食水。根据简单随机分组方法分为假手术组、枕大池一次注血组和二次注血组,每组 13 只动物。

2. 主要试剂 自制质量分数为 10%水合氯醛。多聚甲醛由北京化学试剂公司生产。分析纯二甲苯和无水乙醇均购自北京化学试剂公司。苏木素染液和伊红染液为广东珠海贝索生物技术有限公司产品。

3. 实验仪器 HISTOSTAT-820 旋转式组织切片机构自美国 AO 公司。E600 荧光显微镜由日本 Nikon 公司提供。H-7650 透射电子显微镜为日本 Hitachi 公司产品。

二、研究方法

1. 蛛网膜下隙出血后急性脑血管痉挛动物模型制备 质量分数为 10%的水合氯醛(0.40 ml/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,消毒、颈枕交界区和腹股沟区备皮。大鼠俯卧位,于颈枕交界区剪开长约 1 cm 大小切口,大鼠改仰卧位,于腹股沟区剪开长约 1 cm 大小切口,显露股动脉并置入 24 G 套管针,采用预先经肝素抗凝的 1 ml 注射器采集 0.30 ml 动脉血。大鼠改为俯卧位,于颈枕交界区三角形凹陷处穿刺,回抽见脑脊液后即可缓慢(约 2 min)注射动脉血,按压注血部位以防止所注血液外渗,缝合切口。然后,大鼠头低位 30°约 30 min,以利于血液广泛分布于颅底蛛网膜下隙中,一次注血组动物仅于枕大池注血一次;二次注血组动物于第 1 次注血后 48 h,采集另一侧股动脉血液样本 0.30 ml,再次注入枕大池。假手术组动物仅经股动脉取血 0.30 ml,枕大池注射等量生理盐水。

2. 组织形态学观察 (1)标本制备:所有处理组

动物均于手术后 24 h,腹腔注射质量分数为 10%水合氯醛(0.60 ml/100 g)过量麻醉,开胸灌注取脑,灌注压为 100 cm H₂O(1 cm H₂O=0.098 kPa)。穿刺针置心尖部并固定,紧靠膈肌夹闭腹主动脉至灌注结束,剪开右心耳,室温灌注生理盐水,待流出液体清亮后,4℃、灌注质量分数为 4%多聚甲醛溶液,以大鼠前肢剧烈抽动为灌注成功。断头取全脑,置质量分数为 4%多聚甲醛溶液后固定;24 h 后冠状切取含基底动脉中上段脑组织 2 mm,截取位置如图 1,常规脱水、石蜡包埋,连续冠状切取脑组织切片,厚度为 5 μm,烤片后行 HE 染色。(2)基底动脉血管横截面积观察及测量:Nikon-E600 荧光显微镜(×400)观察基底动脉组织结构,DS-Fil 计算机图像采集系统(日本 Nikon 公司)摄像,Image J 1.37 图像处理软件(卢森堡 Image J 公司)计算基底动脉血管横截面积(利用图片中所标注比例尺将血管像素转化为相应的数值即为血管横截面积),显微镜下观察到血管管壁增厚、内膜皱缩和血管横截面积缩小,即为脑血管痉挛。(3)超微结构观察:经心脏灌注、断头处死大鼠,显微镜下分离基底动脉,质量分数为 2%多聚甲醛和 2.5%戊二醛溶液初固定 2 h,二甲胍酸钠缓冲液(pH 值 7.2)冲洗 10 min(×3);4℃、质量分数为 1%锇酸固定 2 h,双蒸水冲洗 10 min(×3),梯度乙醇脱水,环氧丙烷置换,纯树脂浸透后环氧树脂包埋,修块后行半薄切片,经光学显微镜定位制成超薄组织切片,透射电子显微镜下观察基底动脉超微结构变化。

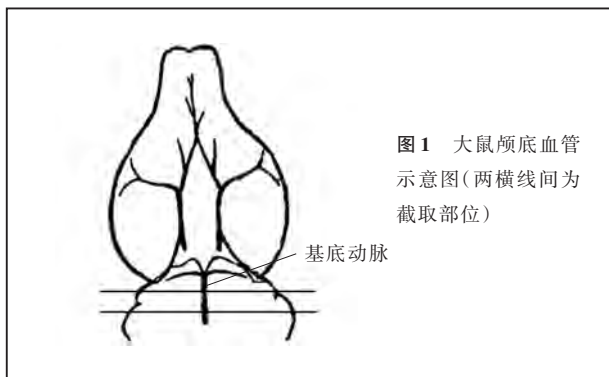


图 1 大鼠颅底血管示意图(两横线间为截取部位)

3. 统计分析方法 采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据计算与分析。不同处理组动物基底动脉血管横截面积以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

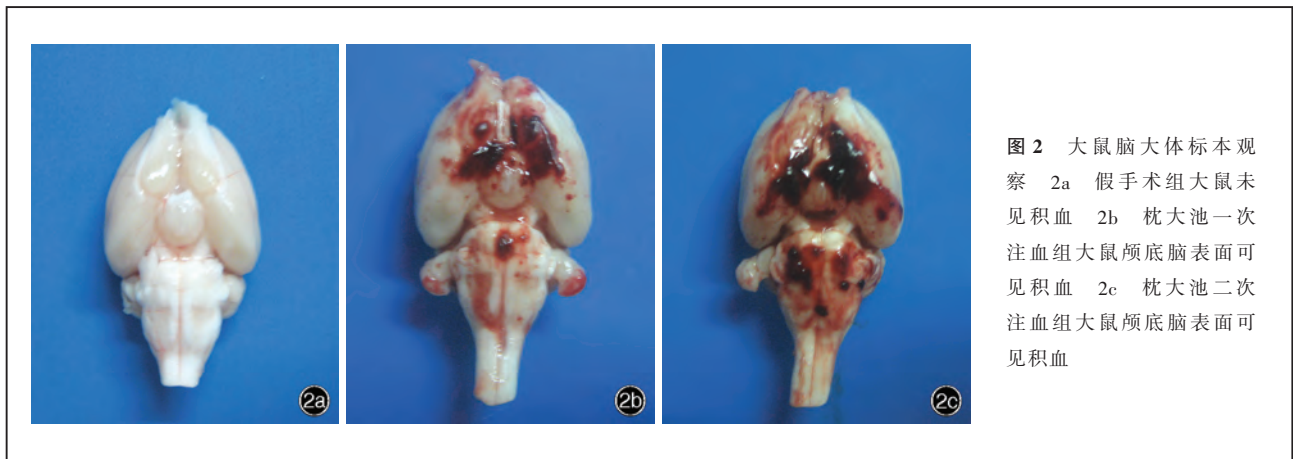


图 2 大鼠脑大体标本观察 2a 假手术组大鼠未见积血 2b 枕大池一次注血组大鼠颅底脑表面可见积血 2c 枕大池二次注血组大鼠颅底脑表面可见积血

结 果

一、一般情况与行为学观察

假手术组大鼠手术后精神、食欲无异常；枕大池一次注血组和二次注血组大鼠均出现毛发蓬松、摄食及日常活动减少等情况，但未见偏瘫、截瘫等严重症状与体征。

二、组织病理学观察

1. 大体标本观察 蛛网膜下隙凝血块大体标本观察显示，假手术组大鼠颅底脑表面和血管周围未见积血；一次注血组和二次注血组大鼠蛛网膜下隙均可见积血，并凝血块形成，但以二次注血组更为明显(图 2)。

2. 基底动脉血管横截面积变化 (1) 光学显微镜观察：蛛网膜下隙出血 24 h，基底动脉管腔狭窄、管壁增厚、内膜皱褶，部分基底膜断裂。基底动脉血管横截面积测量显示，二次注血组大鼠基底动脉血管横截面积小于假手术组，且差异有统计学意义($q = 4.660, P = 0.003$)，略小于一次注血组但差异无统计学意义($q = 2.031, P = 0.166$)；一次注血组大鼠基底动脉血管横截面积略小于假手术组，但差异无统计学意义($q = 2.630, P = 0.070$ ；表 1, 图 3)。(2) 基底动脉超微结构观察：电子显微镜观察显示，假手术组大鼠基底动脉平滑肌细胞和内皮细胞正常，无空泡样变性，内皮细胞呈卵圆形并紧贴其下方的内弹力层，细胞间紧密连接完整；胞核染色体无浓缩、聚集现象。一次注血组大鼠基底动脉内弹力层局部变薄，内皮细胞胞质少量空泡形成，细胞膜损伤、崩解；中膜平滑肌细胞呈空泡样变性。二次注血组大鼠基底动脉平滑肌细胞和内皮细胞胞质发生空

表 1 不同处理组大鼠基底动脉血管横截面积的比较($\bar{x} \pm s, \times 10^{-2} \text{mm}^2$)

组别	样本例数	血管横截面积	F 值	P 值
假手术组	8	3.03 ± 0.37		
一次注血组	8	2.68 ± 0.48	5.460	0.012
二次注血组	8	2.41 ± 0.24		

泡样变性，内皮细胞膜受损(图 4)。

讨 论

蛛网膜下隙出血是临床上较为常见的脑卒中类型，病死率极高。在我国，蛛网膜下隙出血年发病率为 2 ~ 5/10 万，其中，15% 患者尚未就诊即已死亡，30% 患者于出血后 24 h 内死亡。因此，研究蛛网膜下隙出血早期发病机制十分重要，而建立蛛网膜下隙出血动物模型是研究该病的前提。在本研究中，我们通过枕大池注血法复制蛛网膜下隙出血动物模型，结果表明，此法可成功复制蛛网膜下隙出血模型，并可诱发早期脑血管痉挛，且枕大池二次注血组大鼠脑血管痉挛程度更严重，模型更稳定。

早在 1928 年即有学者采用犬制作蛛网膜下隙出血脑血管痉挛动物模型^[1]，其后又相继出现猫、兔、猴等蛛网膜下隙出血脑血管痉挛动物模型的研究报道^[2]。然而，由于这些大型动物价格昂贵，从而限制了实验室的应用。Wistar 大鼠具有价格相对低廉、便于饲养管理，而且其脑血管解剖、蛛网膜下隙出血后的脑血流量变化、颅内压和脑血管痉挛的双相变化，与人类十分接近，故已被广泛用于蛛网膜下隙出血脑血管痉挛的研究^[3-6]。目前，复制蛛网膜下隙出血动物模型主要有 3 种方法，即脑池注血法、

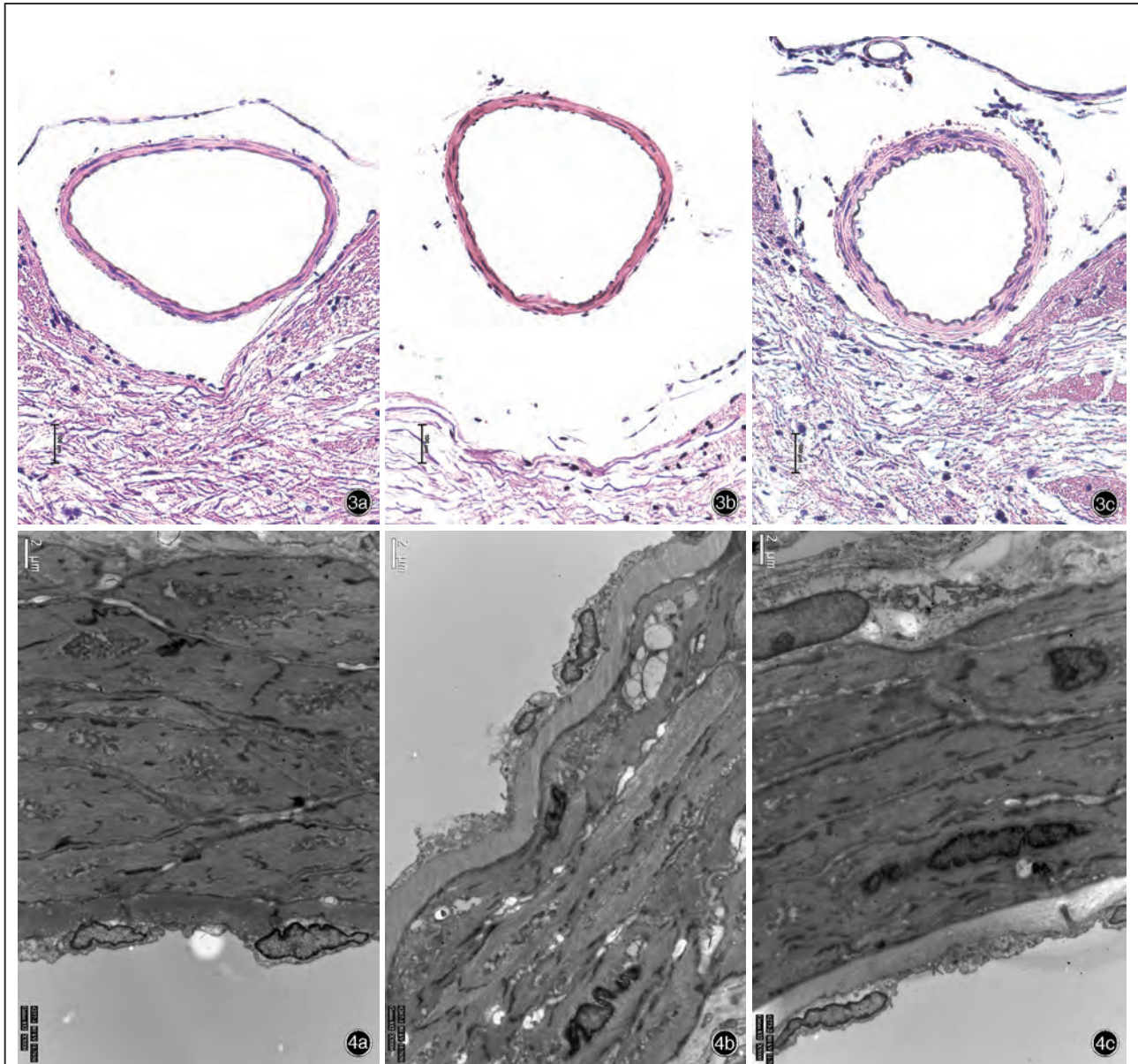


图3 大鼠基底动脉光学显微镜观察 HE染色 $\times 200$ 3a 假手术组大鼠基底动脉正常,无管壁增厚、内膜皱褶 3b 枕大池一次注血组大鼠基底动脉管壁细胞排列稍显紊乱,内膜欠光滑 3c 枕大池二次注血组大鼠基底动脉管腔明显狭窄,管壁增厚,管壁细胞层数增多、排列紊乱,内膜皱褶,呈波浪状 **图4** 大鼠基底动脉超微结构观察 铅铈染色 $\times 5000$ 4a 假手术组大鼠基底动脉平滑肌细胞和内皮细胞正常 4b 枕大池一次注血组大鼠基底动脉内弹力层局部变薄,内皮细胞胞质少量空泡形成,胞膜崩解 4c 枕大池二次注血组大鼠基底动脉平滑肌细胞和内皮细胞空泡样变性

颅内动脉刺破法和动脉周围置血法^[7]。颅内动脉刺破法比较符合蛛网膜下隙出血的临床发病过程,但由于动物出血量不恒定,可影响对实验结果的观察,且易引起脑内出血,动物死亡率较高^[8]。脑池注血法根据注血次数而分为一次注血法和二次注血法,操作简便,可重复性良好,还可以定量、定时、定部位注血^[2],较为多用。在本实验中,我们在枕大池注血时仅在颈部皮肤剪一小口,不显露寰枕膜,对动物的损伤十分轻微,且注血量比较均一,亦减少

了实验误差。然而,由于未刺破血管,无血管本身损伤,而在实际临床病例中动脉瘤破裂常会有血管本身的损害,与临床表现之间可能存在一定差异。本项实验结果显示,蛛网膜下隙出血后注血组大鼠基底动脉可发生一系列组织病理变化:血管内膜增厚、皱褶,细胞层数增多等。其中,枕大池一次注血组和枕大池二次注血组大鼠基底动脉血管横截面积显著缩小,显著小于假手术组。提示:经枕大池一次注血后 24 h 和二次注血后 24 h 大鼠基底动脉均

发生血管痉挛,但程度不同,枕大池二次注血组大鼠血管痉挛程度更为严重。在本研究中,枕大池一次注血组大鼠与假手术组之间差异未达到统计学意义,推测其可能原因:枕大池一次注血对大鼠脑血管刺激程度较轻,出血后 24 h 脑血管痉挛已基本恢复至正常状态。但这一假设尚需进一步扩大样本量加以证实。

通过对 Wistar 大鼠的观察,我们发现经枕大池注血后 24 h 基底动脉即发生病理改变,而且二次注血后基底动脉痉挛程度进一步加重。说明:采用枕大池注血法制备蛛网膜下隙出血脑血管痉挛动物模型,可用于蛛网膜下隙出血后急性脑血管痉挛早期脑损伤等方面的研究。

参 考 文 献

[1] 贾莉,张磊,孙保亮. 脑血管痉挛活体动物模型的研究进展. 中国卒中杂志, 2009, 4:519-523.

- [2] 金清东, 陈志, 林秋泉, 等. 蛛网膜下腔出血动物模型的研究进展. 现代医药卫生, 2007, 23:1803-1804.
- [3] Masuda T, Sato K, Yamamoto S, et al. Sympathetic nervous activity and myocardial damage immediately after subarachnoid hemorrhage in a unique animal model. Stroke, 2002, 33:1671-1676.
- [4] Vatter H, Weidauer S, Koneczalla J, et al. Time course in the development of cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage: clinical and neuroradiological assessment of the rat double hemorrhage model. Neurosurgery, 2006, 58:1190-1197.
- [5] Turowski B, Hanggi D, Beck A, et al. New angiographic measurement tool for analysis of small cerebral vessels: application to a subarachnoid haemorrhage model in the rat. Neuroradiology, 2007, 49:129-137.
- [6] Prunell GF, Svendgaard NA, Alkass K, et al. Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain. J Neurosurg, 2005, 102:1046-1054.
- [7] Titova E, Ostrowski RP, Zhang JH, et al. Experimental models of subarachnoid hemorrhage for studies of cerebral vasospasm. Neurol Res, 2009, 31:568-581.
- [8] 朱庆, 刘艳霞, 李刚, 等. 改良大鼠蛛网膜下腔出血模型. 中国药理学通报, 2006, 22:1144-1146.

(收稿日期:2010-06-30)

第一届全国睡眠障碍高级讲授班暨学术研讨会通知

睡眠医学是一门新兴且发展迅速的综合性学科,其内容涉及神经内科、精神科、呼吸科、耳鼻咽喉科、心血管内科、中医科、心理科、儿科、老年医学科和口腔科等多个学科,中华医学会神经病学分会自 2008 年正式成立睡眠障碍学组以来,一直致力于推动我国睡眠医学研究的发展。为了进一步提高睡眠障碍的诊断、治疗和研究水平,推动睡眠医学研究向纵深发展,中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组拟定于 2010 年 8 月 20-23 日在上海市举办第一届全国睡眠障碍高级讲授班暨学术研讨会,届时将邀请睡眠相关领域的著名专家就睡眠与睡眠障碍的最新研究进展作专题讲座,并进行投稿论文报告,交流近年来本领域在基础和临床等方面的研究成果及经验。会议主要内容包括:睡眠生理学;睡眠神经生物学;睡眠障碍国际分类;青少年睡眠障碍、女性睡眠障碍;老年睡眠障碍;睡眠呼吸障碍及其相关疾病;睡眠呼吸障碍的诊断与处理;失眠及其诊断;失眠的治疗;神经系统疾病与失眠;药源性睡眠障碍;睡眠障碍的评估及睡眠相关量表的应用;焦虑抑郁与睡眠障碍;睡眠运动障碍与神经变性疾病。诚挚地邀请各相关学科同仁踊跃投稿、积极参会,共聚上海,交流学术,共享世博。参会者将授予国家级继续教育 I 类学分 10 分。

会议地点:上海市杨浦区翔殷路 631 号第二军医大学学术活动中心锦雪园。费用:注册费 850 元/人(友情提示:世博会议期间,上海旅馆住宿非常紧张,请尽早确认),在读研究生凭学生证 500 元/人。

联系地址:上海市凤阳路 415 号第二军医大学附属长征医院神经内科。联系人:黄流清教授。邮政编码:200003。联系电话:13371963421(全天开机)。传真:(021)81885451,81885452。

第十届全国神经免疫高级讲授班暨学术研讨会通知

由中华医学会神经病学分会神经病理学组主办的第十届全国神经免疫高级讲授班暨学术研讨会拟定于 2010 年 9 月 14-18 日在广东省广州市召开,届时将邀请全国神经内科知名专家作专题讲座及学术研讨。会议内容包括:神经系统免疫性疾病及相关学科的诊断与治疗进展;多发性硬化和视神经脊髓炎争论焦点和免疫治疗;假瘤型脱髓鞘病的临床及病理;神经免疫性疾病的病理特点;多发性硬化和视神经脊髓炎的诊断与治疗指南;格林-巴利综合征的诊断与治疗;神经免疫学国内外研究进展等。会议还将组织中青年医师进行学术交流,通过举办高级讲授班暨学术研讨会使临床医师及专业技术人员加快专业知识的更新,提高鉴别诊断水平,使临床技术操作更加规范。

联系地址:北京市东四西大街 42 号中华医学会学术会务部。邮政编码:100710。联系人:戴毓平,胡学强。联系电话:13611303028,13609007501。详情请登录 <http://www.medconference.org.cn>。