

## ·实验研究 Experiment research·

## 血管内穿刺法制作兔脑血管痉挛模型

涂建飞, 刘一之, 纪建松, 赵中伟

**【摘要】 目的** 探讨采用血管内穿刺制作兔脑血管痉挛(CVS)模型方法。**方法** 采用血管内穿刺法在新西兰大白兔产生蛛网膜下腔出血(SAH),制作 CVS 模型。存活兔分成 12 h、1、2、3 及 7 d 组,共 5 组,每组分为 SAH 亚组(5 只)及对照亚组(2 只)。每只兔术前、术后常规行头颅 CT 检查,处死后常规行 HE 染色观察后交通动脉及基底动脉管腔内直径及管壁厚度改变。**结果** 本组共 72 只兔,成功制成模型并获取标本 35 只(SAH 组 25 只,对照组 10 只),模型制作成功率为 48.6%。SAH 组后交通动脉及基底动脉管腔内直径在 SAH 后 12 h 分别缩小 43.60%和 51.82%。随后血管直径呈双相改变,管腔直径在第 7 天再次明显缩小,分别下降 29.32%和 45.19%。**结论** 本法造模病理改变明显,是适合研究 CVS 发生机制的动物模型。虽然动物死亡率高,但如能应用新型合适材料并注意操作细节能提高造模成功率。

**【关键词】** 脑血管痉挛; 血管内穿刺; 动物模型

中图分类号:R743. 文献标识码:B 文章编号:1008-794X(2008)-12-0870-04

**Rabbit models of cerebral vasospasm established with endovascular puncture** TU Jian-fei, LIU Yi-zhi, JI Jian-song, ZHAO Zhong-wei. Department of Radiology, Lishui Municipal Central Hospital, Lishui 323000, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the method of endovascular puncture to establish rabbit models of cerebral vasospasm. **Methods** New Zealand white rabbits were divided into 5 groups (12 h, 1 d, 2 d, 3 d and 7 d) randomly, and each group was separated into subarachnoid hemorrhage (SAH) subgroup ( $n = 5$ ) and control subgroup ( $n = 2$ ). cerebral vascular spasm (CVS) models were established after SAH with endovascular puncture. CT scans before and after operation were performed. The internal diameters and the wall thicknesses of posterior communicating artery (PcoA) and basilar artery (BA) were measured with HE stain after the animals were executed. **Results** CVS model was successfully established in 35 rabbits (SAH subgroup 25, control subgroup 10), resulting a successful rate of 48.61%. Compared with control subgroup, PcoA and BA showed shrinkage of internal diameters of 43.60% and 51.82% 12 h after SAH, respectively, and the shrinkage appeared as biphasic patterns until the 7th study day with another peaks of 29.32% and 45.19%, respectively. **Conclusions** Endovascular puncture is an effective method to establish rabbit of CVS. The death rate of animals can be decreased with the usage of new interventional material and perfection for the details of operation. (J Intervent Radiol, 2008, 17: 870-873)

**【Key words】** Cerebral vasospasm; Endovascular puncture; Animal model

采用血管内穿刺法制作的脑血管痉挛(CVS)模型能模拟动脉瘤破裂后颅内压急剧升高,动脉损伤等病理生理改变。本实验采用经兔股动脉途径进入颈内动脉并穿刺动脉的方法产生蛛网膜下腔出血(SAH),制作脑血管痉挛模型,通过普通光镜和透射电镜观察兔颅内血管在早期不同时间点的组织学改变。

作者单位:323000 浙江省丽水市中心医院放射科(涂建飞、纪建松、赵中伟);苏州大学附属一院(刘一之)

通讯作者:涂建飞

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和分组

健康清洁级新西兰大白兔由苏州大学医学院实验动物中心提供,体重 2.5 ~ 3.5 kg,4 ~ 5 月龄。随机分为 12 h、1、2、3 和 7 d 5 大组,每组 7 只,其中又分为 SAH 亚组(每亚组 5 只)及对照亚组(即导丝仅进入但未刺破颈内动脉 ICA),每亚组 2 只。实验操作出现死亡则即予补充。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备 血管内穿刺法制作兔 SAH 模型。30% 乌来糖 (2.0 ~ 3.0 ml/kg) 溶液静脉注射麻醉。兔股动脉引入 0.035 英寸超滑导丝和 4 FH<sub>1</sub> 导管, 将导管插到右侧颈总动脉中上段, 行右颈总动脉造影, 引入塑形的 EXCEL-14 微导管和 Transend 微导丝, 在路图下将导管插到 ICA。然后引入微导丝硬头到 ICA, 快速将导丝推出导管约 1 cm, 重复 1 ~ 2 次后, 退出导丝。最后撤离导管, 右股动脉结扎, 皮肤缝合。

1.2.2 灌注 将各时间组处死兔胸部备皮, 自剑突下沿胸骨两侧旁开 1.5 cm 向上剪开胸腔及心包, 充分暴露心脏及主动脉根部, 在升主动脉根部穿入自制灌注针头, 血管钳固定, 同时剪开右心房放血。夹闭下腔静脉以阻断下腔静脉血回流, 同时并夹闭降主动脉。采用 50 ml 注射器快速灌注 0.1 mol/L PBS 缓冲液。待右房流出清亮液体后。立即开颅取颅内动脉及脑组织, 置入固定液中。

1.2.3 HE 染色及透射电子显微镜观察 每只兔常规行病理检查。切片时选择基底动脉上段、后交通动脉血管切面及附近脑组织。常规 HE 染色, 在 HE×100 的视野下测量腔内血管直径及血管壁厚度, 血管直径测量取管腔内直径纵轴及横轴的均值, 管壁厚度的测量采用 Gules 等<sup>[1]</sup>的方法。同时观察血管周围脑组织有无坏死表现。

12 只兔, SAH 组每组 2 只 (共 10 只) 及对照组 2 只, 仔细解剖后分离出右颈内动脉, 将血管迅速放入预冷的 2.5% 戊二醛溶液固定。常规丙酮梯度脱

水, 618 环氧树脂包埋, 超薄切片后透射电镜观察, 摄片。

1.2.4 模型成功制作的判断标准 我们采用大血管管腔直径缩小为判断血管痉挛标准。若 SAH 组后交通动脉和基底动脉直径同对照组均值差异无统计学意义, 则视为未发生 CVS。若与对照组均值存在差异, 则视为发生 CVS。

1.3 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, SPSS 13.0 统计数据分析包进行 *F* 检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 SAH 模型成功率

本组 72 只兔, 成功制成模型并获取标本 35 只, 模型制作成功率为 48.6%, 其中 SAH 组 25 只, 对照组 10 只。意外死亡 37 只, 死亡原因主要为颅内大出血, 麻醉意外及大动脉损伤等。

2.2 动物行为学观察

本组 SAH 兔术后第 1 天表现为嗜睡, 活动差, 厌食, 以术后 12 ~ 18 h 最重。其中 1 只兔昏睡 2 d。大多数兔 1 d 后精神状态逐渐好转。7 d 时同正常组已无明显不同。

2.3 CVS 的形态学结果

所有 SAH 模型兔, 在各观察时间点内, 后交通动脉及基底动脉均出现管腔内直径缩小, 12 h 组最明显, 随后在第 7 天再次明显收缩。而血管壁厚度的增加, 则以 7 d 组最明显 (表 1)。

表 1 兔脑血管动态改变表 ( $\mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

参数	对照组	实验组				
		12 h	1 d	2 d	3 d	7 d
PCoA 直径	196.81 ± 10.16	110.88 ± 13.30	159.88 ± 11.61	151.89 ± 16.10	139.98 ± 20.67	139.09 ± 8.56
PCoA 管壁	28.45 ± 6.71	32.96 ± 4.24	32.45 ± 7.01	35.18 ± 7.97	34.94 ± 3.71	44.65 ± 8.33
BA 直径	428.72 ± 24.37	206.58 ± 23.32	333.06 ± 23.02	293.40 ± 10.96	338.97 ± 19.37	234.97 ± 16.56
BA 管壁	43.39 ± 3.89	51.36 ± 12.35	52.82 ± 7.13	52.04 ± 7.21	50.95 ± 8.31	62.62 ± 5.70

2.4 CVS 发生率

同对照组血管腔内直径相比较, 1 d 组中 1 只兔未出现腔内直径明显缩小。故 CVS 的发生率为 96%。

2.5 电镜观察

对照组血管壁超微结构正常内皮细胞间紧密连接呈纺锤形。弹力膜排列整齐, 平滑肌细胞肌丝规则。SAH 组血管内皮间紧密连接消失, 部分内皮细胞核固缩, 空泡化。弹力膜扭曲。平滑肌细胞胞质内线粒体肿胀, 空泡化, 粗面内质网扩张, 部份细胞出现核边集, 核固缩 (图 1、2)。

3 讨论

迄今为止, CVS 的发生机制仍不清楚, 因此建立可靠的动物模型对其进行深入研究尤显重要。Megyesi 等<sup>[2]</sup>报道, 目前 SAH 模型的制作方法中, 28% 采用血管穿刺或血管撕裂方法, 72% 采用将血注入蛛网膜下腔或将血块置于血管周围诱发痉挛。

血管穿刺模型的主要优点是血块由颅内血管产生, 能较好的模拟血管破裂后颅内的病理生理改变, 其次是与注血模型不同, 可不受干扰的持续监测血管破裂后颅内压的改变<sup>[1,3]</sup>。自从 1995 年报道

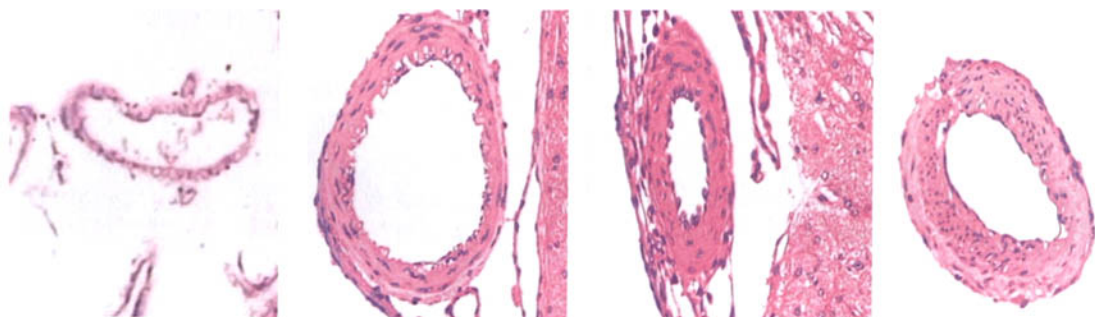


图 1 造模后血管腔及壁改变

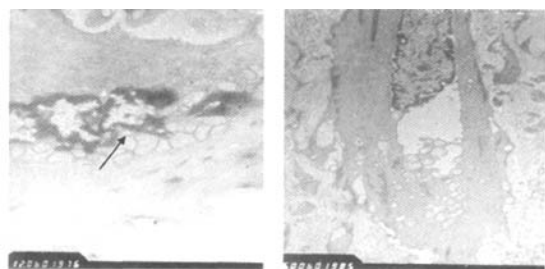


图 2 造模后血管壁组织形态变化

了新的血管内穿刺法制作 CVS 模型后,该模型应用逐渐增多<sup>[4]</sup>。但此类模型均采用鼠作为实验对象,此种模型目前主要应用于 CVS 急性期的生理研究,对于病理形态学变化研究较少。而且鼠血管解剖同人类不同(如血管壁结构不同);侧支丰富,不易出现脑缺血改变,痉挛时间窗短等缺点<sup>[2]</sup>。所以需要选用新的动物制作血管内穿刺法模型并研究其在 CVS 急性期的病理表现,以获取更多该模型的信息。

目前国内外广泛应用的模型就是采用双次注血法制作兔 CVS。其痉挛时间窗同人类的痉挛时间相接近,故我们将兔作为实验动物,研究血管内穿刺 SAH 模型的血管形态学改变。

### 3.1 SAH 模型死亡率的评价

本组模型兔死亡率为 51.2%,死亡率偏高,同文献报道相符。这是该模型的主要不足之处。死亡主要发生在 SAH 后 24 h 内,死亡原因主要是刺破颈内动脉时出血量过多,颅内压瞬时增加,同时尚有导丝对脑组织的损伤所致。本组在死亡兔的术后 CT 扫描发现存在颅内血肿及明显脑挫伤等改变。其次是导管对兔大动脉损伤所致,本组 4 只兔子因腹主动脉及髂动脉严重损伤死亡。因此,在操作上注意动作要轻柔,注意减少对脑组织的损伤,可以有效

降低死亡率。

### 3.2 CVS 血管急性期改变

在 2008 年中华医学会神经外科分会制定的《脑血管痉挛防治神经外科专家共识》征求意见稿中指出:急性 CVS 多于 SAH 后 24 h 内发生,急诊血管造影可发现,多为破裂动脉瘤附近的单侧局灶性血管痉挛。也有文献报道为 SAH 后 48 h 内发生的血管痉挛。CVS 多由载瘤动脉的近端向远端扩展,痉挛的程度以近端最严重,离动脉瘤较远的部分较轻或不发生痉挛。且血管痉挛的部位和严重程度与蛛网膜下腔积血的部位和大小相关。在急性期脑血管造影中,我们经常发现是局限性血管痉挛现象;出血严重者,可见多分支节段痉挛现象,尤其是后交通动脉瘤破裂者。Adnan 等<sup>[5]</sup>对 296 例患者在 SAH 48 h 内行脑血管造影发现,13%患者出现早期痉挛,他认为早期痉挛同脑缺血、神经症状有关,且早期痉挛越重,预后越差。2003 年一项研究发现,SAH 后早期(夹闭术前)有 50%以上患者发生节段性微血管痉挛,血管直径减少可多达 75%,由此引起一系列临床症状。上述研究表明存在早期脑 CVS,且 CVS 不仅存在于大血管,微小血管的痉挛也是重要的组成部分<sup>[6]</sup>。

对于 CVS 的检测方法,常用的有脑血管造影及 TCD 检查。脑血管造影显像直观,是目前诊断 CVS 最可靠的方法。但脑血管造影具有一定损伤性,使其不宜重复,且不能判断微小血管的痉挛。而 TCD 技术能连续或间歇的监测脑血流,既无创伤性,又可重复观测脑血流变化。在 TCD 检测时可见血流频谱紊乱、回声频谱伴杂音<sup>[7]</sup>,临床应用非常普及。随着 CT 发展的重建软件的进一步提升,CTA 以及 CT 灌注在 CVS 的应用逐渐增多。王勇等<sup>[8]</sup>认为相对于 DSA 和 TCD,CTA 更加适合于对实验小动物 CVS

的动态评价。本组由于兔颈内动脉非常细小,动脉插管比较困难,所以未采用血管造影的方法,在实验中采用了 CT 灌注检测脑血管痉挛改变,遗憾的是由于实验数据未达到统计数量,故最后我们仅采用病理结果进行对照研究。所以本组也未进一步研究微小血管痉挛现象。

急性 CVS 的病理生理改变,Sehba 等<sup>[9]</sup>发现存在如脑血流量降低,颅内压升高,急性期脑缺血等现象。也有作者发现 SAH 早期颅内灌注压下降同皮层缺血有一定关系,但皮层缺血主要与血管痉挛相关。由于颅内动脉血流量与血管半径的 4 次幂成反比,因此,血管管径的微小变化即可产生严重的不良后果。如果局部血流量低于维持膜完整性的临界水平,即可发生脑水肿和脑梗死,局部脑水肿可影响脑血流从而进一步加重脑缺血,形成恶性循环。对于急性期 CVS 的病理改变,Lin 等<sup>[3]</sup>在鼠单次注血模型采取多个时间点观察血管内直径及管壁厚度改变,发现 SAH 后 6 ~ 12 h 出现急性期收缩。本组观察发现兔后交通动脉及基底动脉在 12 h 其血管腔内直径明显缩小,但是其管壁厚度没有增加。同时本组发现早期动脉周围脑组织发生大片坏死,脑组织坏死在 SAH 后 2 ~ 3 d 略减少,表明坏死同脑血流量减少有关,当然亦存在导丝对脑组织的损伤。兔在术后第 1 天表现为嗜睡,活动差,可能与脑组织缺血有关。

急性期脑血管收缩的主要原因,目前认为是机械刺激同化学因素如血红蛋白等因素导致血管平滑肌细胞出现收缩所致。其中血块的溶解产物氧合血红蛋白是引起血管痉挛的早期关键因素,也是目前较为肯定的致血管痉挛物质。SAH 后血管长时间浸泡于积血中,其血管调节机制发生紊乱致舒张功能下降、收缩功能增强,从而产生 CVS。此外一系列生物活性因子如内皮素、炎症因子等均参与其中并起着重要作用。如本组研究中发现血小板衍性释放因子在早期急剧升高,在 12 h 达到高峰,同血管收缩相吻合,表明其可能参与此作用。此外,本组也存

在机械刺激的因素。但我们认为其作用比较微小,因为我们采用的是 SAH 后 12 h 的观测点,同时我们采用了对照组,即采用导丝反复刺激兔颈内动脉,在病理研究中,对照组并未出现血管痉挛现象。表明本组机械刺激因素并未干扰试验结果。

血管内穿刺模型存在急性期痉挛表现,可导致颅内缺血改变,主要原因是血管收缩所致,表明急性期是可以干预的。

#### [参考文献]

- [1] Gules I, Satoh M, Clower BR, et al. Comparison of three rat models of cerebral vasospasm[J]. AJP-Heart Circulatory, 2002, 283: H2551 - H2559.
- [2] Joseph M, Bozena V, David C, et al. In vivo animal models of cerebral vasospasm; a review[J]. Neurosurgery, 2000, 46: 448 - 460.
- [3] Lin CL, Calisaneller T, Ukita N, et al. A murine model of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm [J]. J Neuroscience Methods, 2003, 123: 89 - 97.
- [4] Cecil OB, Andy M, Augusto P, et al. Possible role for vascular cell proliferation in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2003, 34: 427 - 433.
- [5] Adnan QI, Gene SY, Asad SMK, et al. Prognostic value and determinants of ultraearly angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Neurosurgery, 1999, 44: 967 - 973.
- [6] Uhl E, Lehmberg J, Steiger HJ, et al. Intraoperative detection of early microvasospasm in patients with subarachnoid hemorrhage by using orthogonal polarization spectral imaging [J]. Neurosurgery, 2003, 52: 1307 - 1317.
- [7] 惠晶晶, 王 中, 王之敏, 等. TCD 观察动脉瘤性 SAH 后脑血管痉挛的血流动力学改变[J]. 中风与神经疾病杂志, 2006, 23: 333 - 335.
- [8] 王 勇, 钟 鸣, 谭显西, 等. 兔枕大池二次注血模型脑血管痉挛的检测方法[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24: 375.
- [9] Sehba FA, Ding WH, Cheresnev F, et al. Effects of S-Nitrosoglutathione on acute vasoconstriction and glutamate release after subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 1999, 30: 1955 - 1961.

(收稿日期:2008-06-10)

# 血管内穿刺法制作兔脑血管痉挛模型

作者: 涂建飞, 刘一之, 纪建松, 赵中伟, TU Jian-fei, LIU Yi-zhi, JI Jian-song, ZHAO Zhong-wei

作者单位: 涂建飞, 纪建松, 赵中伟, TU Jian-fei, JI Jian-song, ZHAO Zhong-wei (丽水市中心医院放射科, 浙江省, 323000), 刘一之, LIU Yi-zhi (苏州大学附属一院)

刊名: 介入放射学杂志 **ISTIC PKU**

英文刊名: JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY

年, 卷(期): 2008, 17(12)

被引用次数: 0次

## 参考文献(9条)

1. Gules I, Satoh M, Clower BR [Comparison of three rat models of cerebral vasospasm](#) 2002
2. Joseph M, Bozena V, David C [In vivo animal models of cerebral vasospasm, a review](#) 2000
3. Lin CL, Calisanneller T, Ukita N [A murine model of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm](#) 2003
4. Cecil OB, Andy M, Augusto P [Possible role for vascular cell proliferation in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage](#) 2003
5. Adnan QI, Gene SY, Asad SMK [Prognostic value and determinants of ultraearly angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage](#) 1999
6. Uhl E, Lehmberg J, Steiger HJ [Intraoperative detection of early microvasospasm in patients with subarachnoid hemorrhage by using orthogonal polarization spectral imaging](#) 2003
7. 惠品晶, 王中, 王之敏 [TCD观察动脉瘤性SAH后脑血管痉挛的血流动力学改变](#)[期刊论文]-[中风与神经疾病杂志](#) 2006
8. 王勇, 钟鸣, 谭显西 [兔枕大池二次注血模型脑血管痉挛的检测方法](#)[期刊论文]-[中华实验外科杂志](#) 2007
9. Sehba FA, Ding WH, Chereshnev F [Effects of S-Nitrosoglutathione on acute vasoconstriction and glutamate release after subarachnoid hemorrhage](#) 1999

## 相似文献(9条)

1. 学位论文 涂建飞 [血管内皮细胞凋亡在兔脑血管痉挛模型的初步研究](#) 2006  
本文分两部分论述了血管内皮细胞凋亡在兔脑血管痉挛模型的初步研究。  
第一部份兔血管内穿刺CVS模型的脑血管病理改变。  
研究目的: 研究兔血管内穿刺模型的脑血管痉挛时间窗和脑血管形态学变化。  
研究材料与方法: 健康清洁级新西兰大白兔72只采用血管内穿刺法即经股动脉穿刺将导管插到兔颈内动脉, 以导丝刺破颈内动脉, 产生蛛网膜下腔出血(Subarachnoid Hemorrhage, SAH), 制作CVS模型。存活兔子随机分成12小时、1天、2天、3天及7天组, 共5大组。每组又根据导丝是否刺破颈内动脉分为SAH1组(5只)及对照组(2只)。每只兔子术前、术后常规行头颅CT检查, SAH评估参考Fisher分级, 分0III级。每只兔子处死后常规行HE染色观察后交通动脉及基底动脉管内直径及管壁厚度改变。选取12只兔子(对照组2只, 每SAH组各2只)的右颈内动脉行透射电镜(Transmission Electron Microscope, TEM)观察血管壁超微结构改变。  
研究结果: 对照组10只及SAH组25只兔子获取脑组织标本。SAH1组中, SAH1级8只, II级14只, III级3只。同对照组相比, 后交通动脉及基底动脉管腔内直径在SAH后12小时分别缩小了43. 6%和51. 82%。随后在1天~7天动脉呈持续性狭窄, 管腔直径在第7天再次明显缩小, 分别下降了29. 32%和45. 19%。7天组后交通动脉及基底动脉管壁厚度均明显增厚, 分别增加了56. 95%和44. 33%。  
研究结论: 兔血管内穿刺CVS模型呈急性期收缩和迟发性收缩双相改变。其痉挛时间窗与血管形态学改变同人类脑血管痉挛基本相仿。兔血管内穿刺CVS模型是研究人类脑血管痉挛发病机制及治疗方法的适合模型。  
第二部份血管内皮细胞凋亡在兔脑血管痉挛中的表达。  
研究目的: 研究脑血管内皮细胞(vascularendothelial cell, VEC)凋亡在兔脑血管痉挛模型中的表达及其时间窗, 初步探讨VEC凋亡在脑血管痉挛中的作用。  
研究材料与方法: 35只健康清洁级新西兰大白兔经血管内穿刺产生SAH1, 制作CVS模型, 随机分成12小时、1天、2天、3天及7天组, 共5大组, 每组7只(其中对照组2只)。所有兔子在各时间点灌注。固定后处死, 选取后交通动脉及基底动脉上段血管制成石蜡切片, 采用三磷酸脱氧尿嘧啶缺口末端标记法(TUNEL法)观察VEC凋亡情况并计数。选取12只兔子(对照组2只, SAH组每组2只)的右颈内动脉行TEM检查, 以了解血管内皮病理改变及VEC凋亡情况。  
研究结果: TUNEL法免疫组化显示: TUNEL阳性细胞出现在SAH1天后, 在2天~7天高表达, 3天组TUNEL阳性细胞数量最多(凋亡率为39%); 电镜显示: SAH组VEC出现空泡化、胞浆浓缩及弹力膜扭曲等改变, SAH后1天出现VEC核固缩改变, 2天与3天组VEC核固缩现象出现几率较高, 7天组VEC未见核固缩改变。  
研究结论: 本研究在兔血管内穿刺脑血管痉挛模型上证实VEC出现凋亡现象。VEC凋亡主要出现在1天后, 持续在2天~7天高表达, VEC凋亡峰值略早于迟发性痉挛高峰期。表明VEC凋亡可能在迟发性脑血管痉挛的早期起作用。



2. 学位论文 [尹风任](#) [大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛及HIF-1 \$\alpha\$ 和VEGF表达的研究](#) 2008

蛛网膜下腔出血(Subarachnoid hemorrhage, SAH)多由动脉瘤破裂出血引起。脑血管痉挛(Cerebral vasospasm, CVS)是蛛网膜下腔出血常见和严重的并发症,发生率达70%,常引起严重的局部脑组织缺血或迟发性脑损伤,甚至导致脑梗死,成为致死或重残的主要原因。目前普遍认为SAH后血液弥散至蛛网膜下腔导致了脑血管痉挛和缺血性神经功能的障碍,但是对SAH后CVS的病理生理机制没有完全研究清楚。对于脑缺血机制的研究主要集中在大血管痉挛方面,但是这种脑血管痉挛不能完全解释迟发性脑缺血的神功能障碍,大脑微动脉的障碍可能在SAH后的脑缺血中起了重要的作用。然而,SAH后大脑微循环的改变存在争议。

缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )是机体缺氧适应过程中起核心调控作用的因子,它通过调节靶基因的转录蛋白在组织氧传递,血管生成,能量代谢方面发挥作用。血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factors, VEGF)是体内促进血管新生最重要的因子,可促进血管内皮细胞增生、迁移及增加血管通透性,VEGF在降低大脑慢性缺血性损伤,促进侧枝循环的建立,减小脑梗塞面积方面起着重要的作用。但是HIF-1 $\alpha$ 和VEGF在蛛网膜下腔出血后大脑皮层中的表达鲜见报道。

目的:通过建立血管内穿刺法大鼠蛛网膜下腔出血模型,应用光镜和透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)观察模型组不同时相的大脑皮层神经元及微血管的病理形态学及超微结构的变化特点,为研究CVS的发生机制提供形态学资料。通过免疫组织化学染色观察HIF-1 $\alpha$ 和VEGF的在大鼠的SAH模型中的表达情况,探讨HIF-1 $\alpha$ 和VEGF在SAH中的表达规律,以及其表达与形态学变化之间的关系,为临床预防与治疗SAH后CVS提供实验依据。

方法:

1. 成年健康雄性Sprague-Dawley大鼠55只,体重260-280g。随机分为3组,正常组5只,假手术组5只,手术组45只,按造模时间再分为术后1h、3h、6h、9h、12h、24h、48h、5d、7d组共9组,每组各5只。手术组采用血管内穿刺法制作SAH模型,假手术组仅做血管内穿刺,不刺破大脑前动脉与大脑中动脉分叉。
2. 各组动物麻醉后,经左心室灌注多聚甲醛固定后取脑。观察各组脑组织的大体形态,各组蛛网膜下腔血液分布情况。光镜观察脑组织病理学变化,透射电镜观察大脑皮层及微血管的超微结构变化。
3. 应用SP法行HIF-1 $\alpha$ 和VEGF免疫组织化学染色,应用专业图像分析软件Image-Pro Plus 5.0(Media Cybernetics公司,美国)测定阳性细胞染色的平均光密度值(MOD)来表示抗原表达量。
4. 应用SPSS15.0统计软件进行数据处理。数据用均数士标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用SNK-T检验,相关分析采用Pearson相关分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果:

1. 脑组织大体观手术组:术后1h可见颈动脉池、视交叉池和基底池明显积血,大脑凸面蛛网膜下腔少量积血。3-24h组可见蛛网膜下腔的积血由脑底面向脑表面扩散,大脑凸面蛛网膜下腔血液弥散范围逐渐增大,48h后脑凸面及颅底面的蛛网膜下腔的血液较前减少,第四脑室可见明显积血。5d组仅基底池可见少量血凝块。7d组蛛网膜下腔的血液基本消失。正常组和假手术组开颅未见蛛网膜下腔有血液。
2. 组织形态学观察手术组:神经元和血管内皮细胞的形态结构的改变主要是大脑皮层神经元变性肿胀,脑水肿。微血管周围间隙稍增宽。在SAH后3h可发现形态结构的改变,SAH后24h到48h脑组织水肿达到高峰。正常对照组及假手术组:脑组织神经元结构基本正常。
3. 大脑皮层及微血管的超微结构观察手术组:神经元和血管内皮细胞的超微结构的改变主要是细胞核内染色质浓集、浓缩,异染色质增多,胞质内线粒体肿胀、嵴紊乱、溶解呈空泡,粗面内质网扩张,脱颗粒现象。血管内皮细胞间紧密连接消失,细胞核内染色质浓集,线粒体肿胀、嵴紊乱,管腔狭窄甚至闭塞。在SAH后1h时可发现超微结构的改变,从6h开始明显的结构改变,在12h至48h结构变化最明显。正常对照组及假手术组:神经元及血管内皮细胞未见异常。
4. HIF-1 $\alpha$ 蛋白在SAH大鼠大脑皮层中的表达实验组于1h、3h大脑皮层神经元开始出现少量的HIF-1 $\alpha$ 的阳性表达,但与对照组比较无统计学意义( $P>0.05$ )。SAH 6h组的HIF-1 $\alpha$ 的阳性表达逐渐增加,其与对照组比较有统计学意义( $P<0.05$ )。HIF-1 $\alpha$ 的阳性表达24h达到高峰并且持续高表达至48h后逐渐下降。7d组的HIF-1 $\alpha$ 的阳性表达与对照组比较差别无显著性( $P>0.05$ )。假手术组与正常组偶见HIF-1 $\alpha$ 阳性表达,二者比较差别无显著性( $P>0.05$ )。
5. VEGF蛋白在SAH大鼠大脑皮层中的表达实验组在1h组大脑皮层VEGF的阳性表达有短暂的升高后,3h,6h组的表达明显降低。9h组VEGF的表达又开始逐渐增高,其与对照组比较有统计学意义( $P<0.05$ )。24h达到高峰,并且持续高表达至48h后逐渐下降,7d组VEGF的阳性表达的,与对照组比较差别无显著性( $P>0.05$ )。假手术组与正常组偶见VEGF阳性表达,二者比较差别无显著性( $P>0.05$ )。
6. SAH大鼠大脑皮层中HIF-1 $\alpha$ 及VEGF蛋白表达相关分析统计学分析表明HIF-1 $\alpha$ 与VEGF在SAH后大脑皮层神经元的表达均呈正相关,相关系数 $r=0.804$ ,且 $P<0.05$ ,相关有统计学意义。

结论:

1. 本实验采用血管穿刺法建立大鼠SAH模型,动态观察蛛网膜下腔的积血分布特点,大脑皮层神经元及微血管的病理形态学和超微结构的变化特点说明造模是成功的,血管穿刺法是制作SAH较为理想的模型。
2. SAH后微血管内皮细胞的损伤可能是SAH后微循环障碍的始动因素,局部微循环功能的障碍可能是造成SAH后缺血性神经功能损害的直接原因。
3. SAH后大脑皮层神经元的HIF-1 $\alpha$ 和VEGF表达明显增加且二者的表达具有相关性,在SAH后的脑缺血缺氧的病理过程中起了十分重要的作用。

3. 会议论文 [涂建飞](#)、[刘一之](#) [血管内穿刺法制作兔脑血管痉挛模型](#) 2007

理想的脑血管痉挛(CVS)动物模型应符合以下条件:①动物出现CVS的症状与人类的CVS症状相似;②制作简单,费用低;③所用动物脑血管变异较少;④可以控制CVS的程度;⑤可用此模型进行慢性实验;⑥在一定的部位有较高的脑缺血发生率;⑦有类似动脉瘤破裂时动脉壁的损伤;⑧有急性颅内压增高的表现;⑨在蛛网膜下腔中有足够量的血凝块。

目前最常用动物模型为采用双次注血法制作的模型,具有可复制性、同人痉挛时间一致、成功率高等优点。但是其忽略了下述因素:(1)SAH急性期颅内压急剧升高。由于动脉损伤,脑组织直接暴露于动脉血压之中,此时收缩压可高达正常颅内压的30-50倍,脑组织受到血流的直接冲击;(2)由于血管壁的直接损伤,在SAH病理生理中起重要作用的血管生物活性物质的释放。血管内穿刺模型较好的解决了上述问题,并能基本符合理想动物模型的条件。采用血管内穿刺法制作兔脑血管痉挛模型未见相关文献报道,本文旨在探讨该模型的制作方法。

4. 学位论文 [吴健](#) [实验性脑血管痉挛中I型钙蛋白酶表达的初步研究](#) 2007

目的:研究I型钙蛋白酶(calpain-I)在兔脑血管痉挛(CVS)模型中的表达及其变化,探讨钙蛋白酶在脑血管痉挛中的作用。

材料和方法:25只健康清洁级新西兰大白兔,5只为正常对照组,其余20只采用血管内穿刺法制作成脑血管痉挛模型,随机分为蛛网膜下腔出血(SAH)12小时、1天、3天、7天组,所有实验兔在规定的时间点麻醉后灌注,取全脑标本置于固定液中。基底动脉制成石蜡切片,用免疫组织化学染色(SP法)观察基底动脉平滑肌中calpain-I的表达,并采用组织化学评分法进行半定量分析,观察其表达的变化。

结果:对照组基底动脉见极少量calpain-I阳性染色平滑肌细胞,SAH2小时组见少量阳性细胞,随着时间的延长,阳性细胞数显著增多,染色强度明显增加,以SAH后3天组为最明显,在SAH后7天组仍可见大量阳性染色平滑肌细胞,但染色强度下降。半定量分析显示蛛血后第3天为calpain-I表达高峰,各组之间calpain-I表达具有统计学差异。

结论:1. SAH后痉挛的脑血管平滑肌存在calpain-I表达增强;2. SAH后脑血管平滑肌内calpain-I表达增强具有早期、渐变、持续性的特点,并且calpain-I可能在CVS的早期起重要作用。3. 为进一步研究各种钙蛋白酶(原)抑制剂治疗CVS提供了合理的时间窗。

5. 学位论文 [李京臣](#) [大鼠蛛网膜下腔出血后大脑皮层超微结构改变及COX-4在神经细胞能量代谢中的表达研究](#) 2009

蛛网膜下腔出血(Subarachnoid hemorrhage, SAH)多由动脉瘤破裂出血引起。脑血管痉挛(Cerebral vasospasm, CVS)是蛛网膜下腔出血常见和严重的并发症,发生率达70%,常引起严重的局部脑组织缺血或迟发性脑损伤,甚至导致脑梗死,成为致死或重残的主要原因。目前普遍认为SAH后血液弥散至蛛网膜下腔导致了脑血管痉挛和缺血性神经功能的障碍,但是对SAH后神经细胞的能量代谢及CVS的病理生理机制没有完全研究清楚。对于脑缺血机制的研究主要集中在大血管痉挛方面,但是这种脑血管痉挛不能完全解释迟发性脑缺血的神功能障碍,大脑微动脉的障碍可能在SAH后的神经细胞能量代谢和脑缺血中起了重要的作用。然而,SAH后大脑微循环的改变存在争议。<br>

细胞色素C氧化酶调节亚基4(Cytochrome c oxidase4, COX-4)是线粒体呼吸链中的一个关键组成部分。COX-4是由nDNA编码的调节亚基,它在10个由nDNA编码的亚基中分子最大(MW约17kD),是其中一个很重要的核编码的亚单位,它们在胞浆中合成后输入线粒体内,与mtDNA编码的亚基装配形成全酶

，COX-4具有COX4-1和COX4-2两种异构体，主要起到结合ATP，使细胞色素C氧化酶（Cytochrome c oxidase, COX）的活性在ATP/ADP比例升高时出现变构性抑制，从而起到调节作用，进而对神经细胞的能量代谢起到至关重要的作用。但是COX-4在蛛网膜下腔出血后神经细胞的能量代谢中的表达鲜见报道。

<br>

目的：通过建立血管内穿刺法大鼠蛛网膜下腔出血模型，应用光镜和透射电镜（transmission electron microscopy, TEM）观察模型组不同时相的大脑皮层神经元、线粒体及微血管的病理形态学及超微结构的变化特点，为研究SAH后神经细胞的能量代谢及CVS的发生机制提供形态学资料。通过免疫组织化学染色观察COX-4的在大鼠的SAH模型中的表达情况，探讨COX-4在SAH后神经细胞能量代谢中的表达规律，以及其表达与形态学变化之间的关系，为临床预防、缓解与治疗SAH后CVS提供实验依据。

<br>

方法：<br>

1. 成年健康雄性Sprague-Dawley大鼠66只，体重260-280g。随机分为3组，正常组6只，假手术组6只，手术组45只，按造模时间再分为术后1h、3h、6h、9h、12h、24h、48h、5d、7d组共9组，每组各6只。手术组采用血管内穿刺法制作SAH模型，假手术组仅做血管内穿刺，不刺破大脑前动脉与大脑中动脉分叉。

<br>

2. 各组动物麻醉后，经左心室灌注多聚甲醛固定后取脑。观察各组脑组织的大体形态，各组蛛网膜下腔血液分布情况。透射电镜观察线粒体、大脑皮层及微血管的超微结构变化。

<br>

3. 免疫组织化学染色检测SAH后神经细胞中COX-4在蛋白水平的表达：免疫组化步骤按试剂盒说明进行操作。在光学显微镜高倍镜（10×40倍）视野下观察阳性细胞。

<br>

结果：<br>

1. 脑组织大体观手术组：术后1h-3h组可见颈动脉池、视交叉池和基底池明显积血，大脑凸面蛛网膜下腔少量积血。3h-24h组可见蛛网膜下腔的积血由脑底面向脑表面扩散，大脑凸面蛛网膜下腔血液弥散范围逐渐增大，24-48h组脑凸面及颅底面的蛛网膜下腔的血液较前减少，第四脑室可见明显积血。5d组仅基底池可见少量血凝块。7d组蛛网膜下腔的血液基本消失。正常组和假手术组开颅未见蛛网膜下腔有血液。

<br>

2. 大脑皮层及微血管的超微结构观察手术组：神经元和血管内皮细胞的超微结构的改变主要是细胞核内染色质浓集、浓缩，异染色质增多，胞质内线粒体肿胀、嵴紊乱、溶解呈空泡，粗面内质网扩张，脱颗粒现象。血管内皮细胞间紧密连接消失，细胞核内染色质浓缩，线粒体肿胀、嵴紊乱，管腔狭窄甚至闭塞。在SAH后1 h时可发现超微结构的改变，从6h开始明显的结构改变，在12h至48h结构变化最明显。正常对照组及假手术组：神经元及血管内皮细胞未见异常。

<br>

3. COX-4蛋白在SAH后大鼠神经细胞能量代谢中的表达手术组：于1h组开始大脑皮层神经元开始出现大量的COX-4的强阳性表达，并且达到高峰。与对照组比较有明显统计学意义。此后表达开始降低，SAH后12h组的COX-4的阳性表达较SAH后1h组有所减少，但与对照组比较仍有统计学意义。降至24h后出现一个最低点，而后又开始表达增强，到48h后又出现一个表达小高峰。随后开始下降，直到7d组的COX-4的阳性表达与对照组比较差别无显著性。假手术组与正常组偶见COX-4阳性表达，二者比较差别无显著性。

<br>

结论：<br>

1. SAH后神经细胞能量代谢障碍以及微循环功能的障碍可能是造成SAH后缺血性神经功能损害的直接原因。

2. SAH后大脑皮层神经元的COX-4表达明显增加，在SAH后的脑缺血缺氧的病理过程中起了十分重要的作用。

## 6. 期刊论文 [孙保亮, 张苏明, 夏作理, 杨明峰, 邱平明, 袁慧](#) [外源性L-精氨酸对大鼠脑血管痉挛的影响](#) -中国医院药杂志2003, 23 (5)

目的:探讨L-精氨酸(L-Arg)对蛛网膜下腔出血(SAH)所致脑血管痉挛(CVS)的影响.方法:应用脑底动脉环血管内穿刺法建立大鼠SAH模型,将动物分为假手术组(SO组)、SAH组和SAH+L-Arg组.动态检测24 h内顶叶皮层局部脑血流量(rCBF),测量基底动脉(BA)管径,并测定不同时点脑组织内皮素-1(ET-1)含量.结果:假手术组对各项指标无显著影响.SAH组术后rCBF迅速降低,并持续24 h;SAH后BA管径明显缩小;脑组织ET-1含量逐渐增加.与SAH组比较,SAH+L-Arg组rCBF下降的速度减慢、程度减轻,BA管径缩小的程度减轻,脑组织ET-1含量增加的幅度减小.结论:L-Arg通过增加NO产生、抑制ET-1生成而缓解SAH后CVS.

## 7. 学位论文 [崔红凯](#) [血小板衍生生长因子-β在兔蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛模型中的表达](#) 2007

目的：研究血小板衍生生长因子-β (platelet-derived growth factor-β，PDGF-β)在兔蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛模型中的表达与时间窗及其意义。

材料与方法：采用血管内穿刺法产生蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)，制作兔脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)模型35只，实验用兔为健康清级新西兰大白兔(由苏州大学医学院实验动物中心提供，体重2.5~3.5kg，月龄4~5)随机分为蛛血后3小时、12小时、1天、2天、3天、7天及14天组，共7组，每组5只。所有兔子在各时间点留取静脉血5ml经离心后取血清，然后用酶联免疫吸附测定法(ELISA法)观察PDGF-BB的表达。将所有兔子在各时间点灌注-固定后处死后常规行HE染色观察后交通动脉及基底动脉管腔内直径及管壁厚度改变，并选取后交通动脉及基底动脉上段血管制成石蜡切片，采用免疫组织化学检测技术的方法观察血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)PDGF-β的表达情况并计数。

结果：正常对照组5只、假手术组5只及SAH组35只兔子获取脑组织标本。同正常对照组及假手术组相比，SAH组后交通动脉及基底动脉管腔内直径和管壁厚度在SAH后明显缩小和增厚。脑血管痉挛后3小时PDGF-β开始上调，3~7天达高峰，14天时仍然高于正常对照组及假手术组。

结论：兔血管内穿刺法制作的CVS模型呈急性期收缩和迟发性收缩双相改变。血管内穿刺法制作的兔蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛模型中显示PDGF-β表达明显上调，且呈现一定的时序性变化规律，在脑血管痉挛发生、发展的病理过程中具有重要意义。

## 8. 期刊论文 [孙保亮, 张苏明, 夏作理, 杨明峰, 邱平明, 袁慧](#) [一氧化氮与脑血管痉挛性神经元损伤和L-精氨酸的作用](#) -中国病理生理杂志2004, 20 (1)

目的:探讨一氧化氮(NO)与蛛网膜下腔出血(SAH)后脑血管痉挛(CVS)所致神经元损伤的关系及L-精氨酸(L-Arg)的保护作用.方法:应用血管内穿刺法建立大鼠SAH模型,将动物随机分为假手术组(SO组)、SAH组和SAH+L-Arg组.动态检测24 h内大脑顶叶皮层局部脑血流量(rCBF),测量基底动脉(BA)管径变化,测定不同时点血清NO(NO-2/NO-3)水平和血浆ET-1含量,并行海马神经元形态学观察.结果:假手术对各项指标无显著影响.SAH组术后rCBF迅速降低,1 h达最低点,并持续24 h;SAH后BA管径明显缩小;血清NO-2/NO-3含量明显减少,血浆ET-1含量逐渐增加,海马神经元显著损伤.与SAH组比较,SAH+L-Arg组rCBF下降的速度减慢、程度减轻;BA管径缩小的程度减轻;血清NO-2/NO-3水平降低和血浆ET-1含量增高的变化减轻;海马神经元损伤的程度减轻.结论:血清NO浓度的降低参与了CVS性神经元损伤,L-Arg对之具有一定减轻作用.

## 9. 学位论文 [范晨](#) [一种新的兔蛛网膜下腔出血模型建立及脑血管痉挛的初步研究](#) 2009

蛛网膜下腔出血(SAH)绝大多数系脑动脉瘤破裂所致，其死亡率达到22~25%。SAH最常见的并发症是脑血管痉挛(CVS)，由其引起的脑缺血和脑梗死是致残和致死的重要原因之一。迄今为止，CVS的治疗仍然十分棘手。尽管在CVS的基础实验上作了大量深入研究并取得了诸多突破，但在临床上仍难以取得令人满意的疗效，对于CVS的发生机制及防治措施尚需深入研究。本课题拟建立一种和颅内动脉破裂出血引起SAH相似病理过程的动物模型，从而进一步探明CVS发生机制，寻找能准确预示CVS发生的可靠指标，并在此基础上寻找更加有效的抗CVS的药物及治疗方法。

第一部分兔蛛网膜下腔出血模型的建立

目的:建立一种能更接近人脑动脉瘤破裂引起SAH过程的动物模型，进一步探明CVS发生机制。

方法:通过介入法经股动脉路径穿刺颅内动脉，造成SAH，然后将60只实验兔分按各时间点(对照组、假手术组、术后0h、3h、6h、12h、1d、3d、7d、14d)分成10组，每组6例，行脑血管造影，然后灌注-固定，处死后取基底动脉切片常规行HE染色观察，通过图像分析系统分析，测定动脉内径及血管壁厚度。

结果:兔血管内穿刺法制作的SAH模型呈急性期脑血管痉挛(SAH后12h)和迟发性脑血管痉挛(SAH后7d)双相改变。

结论:此动物模型能较好地模拟动脉瘤性SAH后血管痉挛改变的病理过程。

第二部分脑血管痉挛过程中血管内皮增生机制的研究

目的:探讨血管内皮增生机制在SAH后CVS形成中的作用。

方法:将60只实验兔按各时间点(对照组、假手术组、术后0h、3h、6h、12h、1d、3d、7d、14d)分组，每组6例，留取实验兔静脉血，利用ELISA法检

测血清IGF-1、FGF、TGF- $\beta$  1等指标,进行统计学分析。动物处死后取基底动脉切片行 $\alpha$ -actin免疫组化检测增殖内皮细胞来源,增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组化检测增殖细胞表达情况并计数。

结果:SAH后IGF-1、FGF、TGF- $\beta$  1值表达均有异常,TGF- $\beta$  1值于SAH后12小时达到谷值、FGF值于SAH后3天达到峰值、IGF-1值于SAH后6小时达到峰值,基底动脉管壁的PCNA阳性细胞数至SAH后7天达到峰值,峰值维持到SAH后14天,在迟发性痉挛期脑血管存在血管平滑肌细胞增殖和内移。

结论:血管内皮增生参与迟发性脑血管痉挛过程。

第三部分曲匹地尔防治脑血管痉挛的实验研究

目的:研究曲匹地尔对不同时期脑血管痉挛的防治作用。

方法:将12只兔于SAH后摄入曲匹地尔,分别于各指标出现峰(谷)值的时间点检测血清IGF-1(SAH后6h)、FGF(SAH后3d)、TGF- $\beta$  1(SAH后12h)水平,同时脑血管造影,然后按急性痉挛期(12h)及迟发性痉挛期(7d)分2组,每组6例,处死获取基底动脉切片,HE染色观察测定动脉内径及壁厚,行 $\alpha$ -actin及PCNA免疫组化并行PCNA阳性细胞计数,再将检测值分别与对应时间段SAH兔模型的检测值进行比较分析。

结果:曲匹地尔可降低兔SAH后血清FGF水平,升高血清TGF- $\beta$  1水平,对基底动脉急性痉挛无缓解作用,对基底动脉迟发性痉挛有缓解作用。

结论:曲匹地尔对急性脑血管痉挛的防治效果不显著,对迟发性脑血管痉挛具有较好的防治效果。

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_jrfsxzz200812010.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200812010.aspx)

授权使用: qknfy(qknfy), 授权号: 1520d5e9-4ec8-4aa7-8b38-9df701818c49

下载时间: 2010年9月20日