

• 实验研究 Experimental research •

血管内皮细胞凋亡在兔脑血管痉挛模型的初步研究

涂建飞, 刘一之, 纪建松

【摘要】 目的 采用兔脑血管痉挛模型研究脑血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)凋亡的表达及时间窗, 初步探讨 VEC 凋亡在脑血管痉挛中的作用。**方法** 35 只健康清洁级新西兰大白兔经血管内穿刺产生蛛网膜下腔出血(SAH), 制作脑血管痉挛模型, 按处死时间将实验动物分为 12 h、1、2、3、7 d 共 5 组, 每组 7 只。每组又分为 SAH 亚组 5 只及对照亚组 2 只(即导丝仅进入但未刺破颈内动脉)。动物处死后, 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。每组取动物 2 只, 对照动物 2 只, 共 12 只右颈内动脉行电镜检查, 了解血管内皮病理改变及 VEC 凋亡情况。**结果** TUNEL 法显示, TUNEL 阳性细胞出现在 SAH 1 d 后, 在 2~7 d 高表达, 3 d 组 TUNEL 阳性细胞数量最多(凋亡率为 39%)。电镜显示, SAH 亚组 VEC 出现空泡化、胞质浓缩及弹力膜扭曲等改变, 1 d 组出现 VEC 核固缩改变, 2、3 d 组 VEC 核固缩现象出现概率较高, 7 d 组 VEC 未见核固缩改变。**结论** 研究证实 VEC 凋亡峰值略早于迟发性痉挛高峰期, 表明内皮细胞凋亡在脑血管痉挛中起重要作用。

【关键词】 脑血管痉挛; 蛛网膜下腔出血; 内皮细胞; 凋亡; 动物实验

中图分类号: R743.3 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2013)-07-0574-04

The apoptosis of cerebral vascular endothelial cells: a preliminary study in rabbit models with cerebral vasospasm TU Jian-fei, LIU Yi-zhi, JI Jian-song. Department of Radiology, Lishui Municipal Central Hospital, Lishui, Zhejiang Province 323000, China

Corresponding author: LIU Yi-zhi, E-mail: liuyz-sz@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression and time window of endothelial cells apoptosis in rabbit models with cerebral vasospasm, and to discuss the action of vascular endothelial cell (VEC) apoptosis on cerebral vasospasm. **Methods** By endovascular puncturing method subarachnoid hemorrhage (SAH) was created in 35 healthy New Zealand rabbits, which were used to establish cerebral vasospasm models. According to the scheduled sacrifice time (12 hours, one, 2, 3 and 7 days), the rabbits were randomly divided into five groups with 7 rabbits in each group. Every group were further subdivided into SAH subgroup ($n = 5$) and control subgroup ($n = 2$). In control subgroup, the guide-wire was inserted in the internal carotid artery but did not break the artery. After the rabbits were sacrificed, the posterior communicating artery and the upper segment of basilar artery were collected and sent for pathologic examination. The TUNEL stain technique was used to observe the apoptosis of endothelial cells in sectioned slices. Every two rabbits from each SAH subgroup and two rabbits of control subgroup (12 rabbits in total) were collected. The right carotid arteries of these 12 rabbits were examined with electron microscopy to observe the pathological changes and the apoptosis of vascular endothelial cells. **Results** TUNEL immunohistochemical study showed that TUNEL positive staining cells appeared one day after SAH, and the expression reached its peak in 2 - 7 days. The

maximum number of TUNEL positive staining cells was found in the rabbits of 3 - day SAH subgroup, and the apoptosis rate was 39%. Electron microscopy examination demonstrated vacuolization, cytoplasm condensation, torsion of elastic membrane, etc. in VEC of SAH

项目资助: 丽水市科技局 2012 年社会公益项目资助 (2012ZC032)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2013.07.012

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

通信作者: 刘一之 E-mail: liuyz-sz@163.com

subgroups. Nuclear condensation of VEC was found in the rabbits of one-day SAH subgroup, the nuclear condensation of VEC was more frequently seen in the rabbits of 2-day and 3-day SAH subgroups, while no nuclear condensation of VEC was found in the rabbits of 7-day SAH subgroup. **Conclusion** This study proves that the peak value of VEC apoptosis appears slightly earlier than that of the delayed cerebral vasospasm in the rabbit models of cerebral vasospasm produced by endovascular puncturing method, indicating that the apoptosis of endothelial cells plays an important role in the pathogenesis of vasospasm. (J Intervent Radiol, 2013, 22: 574-577)

[Key words] cerebral vasospasm; subarachnoid hemorrhage; endothelial cell; apoptosis; animal model

自从 Zubkov 等于 2000 年首先报道 1 例因脑血管痉挛死亡患者的基底动脉内膜存在内皮细胞凋亡的事实后,人们开始关注血管内皮细胞(VEC)凋亡在痉挛中的临床作用。而早期脑损伤概念^[1-3]的提出,更是引发了 VEC 凋亡的研究热潮。研究发现,早期脑损伤可能通过细胞凋亡、炎症反应、缺血机制,最终导致细胞死亡,进而导致血脑屏障破坏、脑水肿,以至于神经元坏死。而早期脑损伤是死亡的重要原因,也是迟发性功能障碍的重要因素。因此,干预 VEC 凋亡成为治疗脑血管痉挛的新靶点。然而,对于 VEC 凋亡的发生时间、意义则缺乏相关的研究,本文拟通过电镜及免疫组化观察 VEC 凋亡在脑血管痉挛中不同时间点的表达,为临床治疗提供理论依据并开拓新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

35 只 4~5 月龄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,随机分为 12 h、1、2、3、7 d 组,每组 7 只。每组又分为蛛网膜下腔出血(SAH)亚组 5 只及对照亚组 2 只(即导丝仅进入但未刺破颈内动脉)。出现死亡则给予补充。

1.2 动物模型的制备

采用血管内穿刺法制作兔 SAH 模型。用 30% 乌来糖(2.0~3.0 ml/kg)溶液静脉注射麻醉成功后,采用外科方法通过兔股动脉引入 0.035 英寸超滑导丝和 4 F H₁ 导管,将导管插到右侧颈总动脉中上段,常规行右颈总动脉造影,了解颈内动脉起始段血管走行。随后引入塑形的 EXCEL-14 微导管(Boston 公司)和 Transend 微导丝(Cordis 公司),在路图状态下将导管插到颈内动脉。然后引入微导丝硬头到颈内动脉,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。

1.3 透射电镜及免疫组化观察

1.3.1 透射电镜观察 12 只实验兔(SAH 亚组 10 只,对照组 2 只)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,行超薄切片后透射电镜观察、摄片。

1.3.2 免疫组化观察 三磷酸脱氧尿嘧啶缺口末端标记法(TUNEL)操作按检测试剂盒(美国 Biovision 公司)说明书进行。在显微镜下观察拍照。凋亡细胞的判定:细胞核固缩、致密、黄色或棕色改变;未凋亡细胞核呈蓝色改变。每张玻片在显微镜高倍视野下观察基底动脉(BA)及后交通动脉(PCoA)的内皮细胞,计数 TUNEL 阳性细胞及正常内皮细胞,用百分数表示,统计凋亡率。

1.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件包进行 *F* 检验,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 动物行为学观察

各 SAH 亚组动物术后第 1 天表现为嗜睡,活动差,厌食,以术后 12~18 h 最重。其中 1 只实验兔昏睡 2 d。大多数动物 1 d 后精神状态逐渐好转。7 d 时同正常组无明显不同。

2.2 血管痉挛的形态学结果

在各观察时间点内,所有 SAH 亚组动物 PCoA 及 BA 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)。

2.3 电镜表现

SAH 亚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

表 1 动物脑血管动态改变

($\bar{x} \pm s$)

参数	对照组	12 h 组	1 d 组	2 d 组	3 d 组	7 d 组
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

注:PCoA = 后交通动脉,BA = 基底动脉

出现核边集,核固缩(图 1)。PCoA 内皮细胞凋亡动态变化见图 2。



图 1 SAH 后 2 d,内皮细胞核边集,凋亡样改变

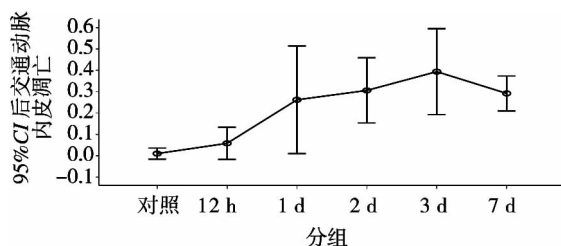


图 2 内皮细胞凋亡时间曲线图

2.4 内皮细胞凋亡表现

PCoA 内皮细胞凋亡率(%)在对照组、12 h、1、2、3、7 d 组 凋亡率分别为 0.01 ± 0.02 、 0.06 ± 0.06 、 0.26 ± 0.20 、 0.31 ± 0.12 、 0.39 ± 0.16 、 0.29 ± 0.07 。对照组内皮细胞核呈蓝色,未见 TUNEL 阳性细胞。SAH 亚组中,12 h 组和 7 d 组偶见 TUNEL 阳性细胞(图 3、4),1 d 组内皮细胞出现 TUNEL 阳性细胞,在 3 d 组达到高峰。7 d 组较前有所下降。对照组与 1、2、3、7 d 组比较差异有统计学意义($P < 0.02$);2 d 组和 3 d 组分别与 12 h 组和 1 d 组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。本组平滑肌细胞可见 TUNEL 阳性细胞,与电镜表现相符。由于多张切片未找到 BA 血管断面,未对 BA 行统计学分析。

3 讨论

细胞凋亡是调节机体生长、发育及维持机体细胞平衡的重要生理机制。然而,当其调节紊乱,则会导致疾病的发生。近期研究表明,脑血管疾病特别是缺血性脑血管疾病(包括狭窄与痉挛)的病理损伤程度与细胞凋亡密切相关。SAH 后痉挛血管壁内皮细胞存在凋亡现象,在脑血管痉挛形成机制中起

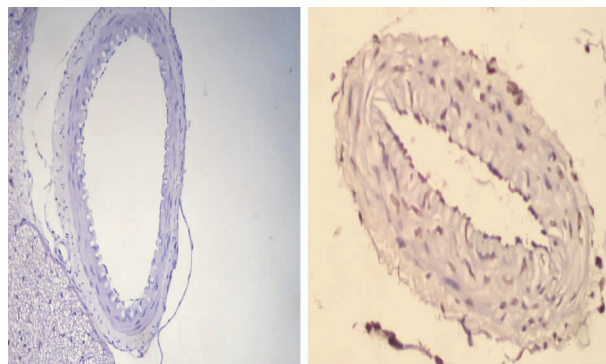


图 3 SAH 后 12 h BA 内皮 细胞无凋亡,部分内皮细胞脱落(HE,× 100)

图 4 SAH 后 2 d PCoA 内皮 细胞凋亡(HE,× 40)

重要作用^[4-6]。本研究拟重点观察细胞凋亡的时间窗及意义,为今后深入研究凋亡的价值作一铺垫。

本实验发现 SAH 后 12 h VEC 凋亡不明显,在第 1 天少量出现,在 2~3 d 明显增加,3 d 组达到峰值,7 d 组明显下降。两种观察法均支持此点。对于凋亡的出现时间与叶伟等^[7]和 Cahill 等^[8]的研究基本相符,实验均证实 VEC 凋亡出现的时间可能在 SAH 后 24 h,细胞凋亡进一步造成血脑屏障的完整性受到影响,导致脑水肿及细胞坏死,可能是加重早期脑损害的主要原因。

对于细胞凋亡的持续时间,Cahill 等^[8]采用大鼠穿刺模型研究 24、72 h 的血管凋亡情况,虽然血管痉挛持续 72 h,但是发现凋亡在 24 h 明显升高,72 h 下降。史焕昌等^[9]采用兔注血模型在 SAH 后 72 h 检查发现 VEC 凋亡。游鸿海等^[10]在二次注血的兔模型上发现,细胞凋亡和 Cyt-C 表达均在 SAH 后增多,于第 7 天达高峰,第 10 天逐渐下降。Zubkov 等对二次注血的狗模型行血管造影发现,SAH 后 3 d 开始出现血管痉挛,7 d 达高峰。通过形态学检查发现,3 d 在痉挛血管内皮出现凋亡样细胞,凋亡程度随时间加重。这种凋亡时间上的改变,目前认为氧合血红蛋白是细胞凋亡的主要诱因。血块中分解出代谢产物(如氧合血红蛋白)需要一定的时间,而氧合血红蛋白一般在 2 d 内从外膜穿过血管壁并停留在内皮,故本实验 VEC 凋亡高峰出现时间迟,在 2~3 d 达到高峰。至于细胞凋亡高峰时间不同的原

因可能是:① 动物种类的差别。选用不同种属的动物,可能出现不同的观察结果。② 制作方法不同。注血法是由于脑池内血块分解出代谢产物,凋亡诱因再作用于血管内皮需要一段时间,因而可能表现为凋亡时间延迟。而我们采用血管内穿刺法,细胞因子和血管剪切力等因素均在早期作用于内皮,可能使细胞凋亡峰值提前。我们认为二次注血模型虽然在痉挛时间上模拟了人的痉挛时间,但二次注血的凋亡诱因多次作用于内皮,可能不能准确模拟 VEC 凋亡的时间窗。

通过本组实验,我们认为早期的少量细胞凋亡可能是细胞因子等因素直接作用于内皮所致,而后期的大量凋亡则是氧合血红蛋白作用的结果。在后期,氧合血红蛋白浓度下降,导致 VEC 凋亡减少,这可部分解释本实验中 7 d 组 VEC 凋亡减少的原因。

本实验亦发现血管壁的平滑肌细胞和成纤维细胞均出现凋亡改变。细胞凋亡以 SAH 后 1、2 d 明显,凋亡峰值时间早于脑血管痉挛,表明凋亡诱因作用于血管壁全程,本实验中,3、7 d 组出现胶原增多,平滑肌细胞和成纤维细胞增生可能与此有关。Park 等的实验结果表明,SAH 后脑血管痉挛过程中确实有细胞凋亡的发生,细胞凋亡的程度以受累 VEC 为最重,其次是某些下丘脑神经元细胞,大脑皮层受累最轻,表明细胞凋亡在脑血管痉挛的后期亦是重要因素,主要是在迟发性痉挛的早期阶段发挥作用,主要通过刺激细胞增生、损伤神经元细胞等方式参与。

细胞凋亡的途径主要有两条^[11],一条是通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶 caspase,另一条是通过线粒体释放凋亡酶激活因子激活 caspase。这些 caspase 的活化可将细胞内的重要蛋白降解,引起细胞凋亡。有文献报道,通过细胞凋亡的通路抑制细胞凋亡,虽然不能预防脑血管痉挛,但能改善临床症状,减轻早期脑损害,上述研究为治疗和预防脑血管痉挛阐释增加了新的思路^[12-15]。

本实验中,BA 多支血管断面未找到内皮细胞,主要是 VEC 在受到刺激后容易脱落,其次是 TUNEL 法的固有缺陷,在以后的研究中,可考虑辅以 Western 印迹技术检测 ADP 核糖多聚合酶 (PARP) 判断 VEC 凋亡,从而提高判断凋亡的准确性。

综上所述,本研究在兔脑血管穿刺模型上证实 VEC 出现凋亡现象,凋亡主要出现在 SAH 后 24 h,本组在 3 d 达峰,略早于迟发性痉挛的峰期,表明

VEC 凋亡在脑血管痉挛中起重要作用。

参考文献

- [1] Cheng G, Wei L, Zhi-dan S, et al. Atorvastatin ameliorates cerebral vasospasm and early brain injury after subarachnoid hemorrhage and inhibits caspase-dependent apoptosis pathway [J]. BMC Neurosci, 2009, 10: 7.
- [2] Cahill J, Zhang JH. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction? [J]. Stroke, 2009, 40: S86 - S87.
- [3] Cahill J, Calvert JW, Zhang JH. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26: 1341 - 1353.
- [4] 李冉, 秦川, 高俊玲, 等. VEGF/ERK 通路在蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛中的作用及机制探讨 [J]. 现代预防医学, 2010, 37: 2292 - 2293, 2297.
- [5] Yan JH, Yang XM, Chen CH, et al. Pifithrin- α reduces cerebral vasospasm by attenuating apoptosis of endothelial cells in a subarachnoid haemorrhage model of rat [J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121: 414 - 419.
- [6] He Z, Ostrowski RP, Sun X, et al. Targeting C/EBP homologous protein with siRNA attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. Exp Neurol, 2012, 238: 218 - 224.
- [7] 叶伟, 王晓峰, 赵春波, 等. 蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛与 c-myc, c-fos, c-jun 表达的关系 [J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23: 1118 - 1120.
- [8] Cahill J, Calvert JW, Solaroglu I, et al. Vasospasm and p53-Induced apoptosis in an experimental model of subarachnoid hemorrhage [J]. Stroke, 2006, 37: 1868 - 1874.
- [9] 史焕昌, 毛伯镛, 施贤清. 蛛网膜下腔出血后脑屏障通透性的实验研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2006, 23: 475 - 477.
- [10] 游鸿海, 王灯亮, 康德智, 等. 细胞色素 C 在兔蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛中的作用 [J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2011, 16: 231 - 234.
- [11] 叶伟, 王晓峰, 赵春波, 等. 蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的发生机制研究进展 [J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23: 124 - 126.
- [12] 余建明, 莫云长, 梁冬冬, 等. 尼莫地平对兔症状性脑血管痉挛的保护效应 [J]. 中华医学杂志, 2011, 91: 345 - 349.
- [13] Endo H, Nito C, Kamada H, et al. Akt/GSK3 β survival signaling is involved in acute brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Stroke, 2006, 37: 2140 - 2146.
- [14] Suzuki H, Sozen T, Hasegawa Y, et al. Caspase-1 inhibitor prevents neurogenic pulmonary edema after subarachnoid hemorrhage in mice [J]. Stroke, 2009, 40: 3872 - 3875.
- [15] Sugawara T, Jadhav V, Ayer R, et al. Thrombin inhibition by argatroban ameliorates early brain injury and improves neurological outcomes after experimental subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Stroke, 2009, 40: 1530 - 1532.

(收稿日期:2012-10-04)

(本文编辑:侯虹鲁)