

机械性脑血管痉挛与血管内皮细胞缺血瀑布级联效应的实验观察*

潘 颖¹ 张绍东² 罗 芳³ 张淑珍³

摘要 目的:观察术中急性机械性脑血管痉挛,早期(2h)大脑中动脉(MCA)血管内皮细胞的反应。**方法:**6只猫,眶后入路,暴露右侧MCA,机械刺激30min,观察刺激后不同时段,血管直径的改变;高效液相色谱(HPLC)分析颞叶皮质间隙谷氨酸Glu浓度变化;镜下观察颞叶皮质形态学和MCA血管内皮细胞结构的改变。**结果:**机械性刺激MCA后,MCA直径缩小,为刺激前的68.78%。脑组织灌流指数下降到刺激前的42.59%。刺激结束后2h,MCA直径恢复正常。脑组织灌流量恢复到刺激前的61.87%。HPLC显示颞叶和枕叶脑组织间隙兴奋性氨基酸急剧升高,光镜下颞叶皮质神经元固缩,血管周围水肿。电镜观察发现,MCA经急性机械性刺激后早期(2h)MCA内皮细胞染色质聚集,凝聚成新月形小体。线粒体嵴模糊不清。**结论:**机械性刺激猫脑MCA诱发血管痉挛早期(2h)显示内皮细胞的缺血瀑布级联效应,与神经元细胞凋亡相呼应。但是其病理过程与蛛网膜下腔出血、脑卒中引发的血管内皮细胞的凋亡和血管痉挛不同。提示,颅脑手术或动物实验中机械性脑血管痉挛可能影响术后神经功能的康复。

关键词 脑血管痉挛;内皮细胞;级联效应;康复

中图分类号:R49,R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2006)-08-0675-03

Observation of vessel endotheliocyte reactions in the early stage of acute mechanical cerebral vasospasm/PAN Ying,ZHANG Shaodong,LUO Fang,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006,21(8):675—677

Abstract Objective:Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage or stroke is prolonged contraction that leads to cerebral ischemia or infarction.The studies have shown dystrophy of endotheliocyte. But the reactions of vessel endotheliocyte in the early stage (2 hours after stimulation finished) of acute medianical MCA vasospasm remain unknown. **Method:**The right MCA of six cats were persistent mechanical stimulated using a small smooth stainless steel nail in the field acrossing the olfactory tract for 30 minutes.The changes of MCA diameter was measured by metrical ocular of microscope. The changes of the perfusion index of brain tissue were observed through the Laser Doppler flowmetry monitor fixed on the skull. The concentration of Glu was examined by HPLC.The ultrastructure of vessel endotheliocytes were investigated through the electron microscope.**Result:**The diameter of MCA decreased to 68.76% of normal,two hours later the diameter of MCA recovered. The perfusion index of the cortex surface decreased to 42.95% of normal and up to 61.87% 2 hours later.During this time,the concentration of Glu increased to 46 times of normal. There is no marked difference between the temporal lobe and the occipital lobe. The chromatin of endothliocyte concentration to the side and form the lunular body,2 hours after the mechanical stimulation.**Conclusion:** Ischemia cascade effect occurred in the endothelial cells in the early stage of acute mechanical cerebral vasospasm.The possible role of endothelial cells in cerebral vasospasm is discussed in this article.

Author's address Dept. Biochemical and Molecular Biology,Capital University of Medcial Science,Beijing,100069

Key words cerebral vasospasm;endotheliocyte;cascade effect; rehabilitation

神经保护是指对受损伤的神经组织予以积极的保护或修复,去除或减少造成组织损伤的因素。避免相邻正常的神经组织进一步受到损伤,挽救未死亡的神经组织,并使之恢复或部分恢复原有功能。某些颅脑手术和脑部动物实验中会不可避免的对脑血管进行牵拉、夹闭等机械性刺激,导致急性机械性脑血管的痉挛(cerebral vasospasm,CVS)的发生^[1],目前这种术中急性机械刺激后,早期对脑血管病理预后的影响,尚未见报道^[2-4]。血管内皮细胞的功能,是神

经细胞损伤或修复的基础,急性机械性 CVS 时血管内皮细胞是否也会经历如蛛网膜下隙出血后的缺血瀑布级联效应(ischemia cascade effects),本研究试

* 基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7992021)

1 首都医科大学生物化学暨分子生物学系,100069

2 北京市神经外科研究所

3 首都医科大学附属北京天坛医院麻醉科

作者简介:潘颖,男,副教授

收稿日期:2005-10-24

图对此进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年、健康的杂种猫 6 只(北京市神经外科研究所动物室提供),雌雄不限,体重 2.5—3.5kg。术前 1 周饲养于实验环境中,术前一天禁食,自由进水。常规 20%水合氯醛腹腔注射(2ml/kg)麻醉。气管切开,插管接呼吸机。维持正常的呼气末 PaCO_2 。股动脉插管,监测血压、持续监测心电图、脉搏和血氧饱和度。体温保持 37℃。

1.2 实验动物模型制备

猫取俯卧位,正中切开头皮,于前囟后 1.5cm,旁开 1.5cm 开方形骨窗, (8×10)mm²,挑破硬脑膜,选择无血管或少血管的脑表面固定激光多普勒血流计(Feriflux system5000 PERIMED)的微细探头和微透析探针。再使动物侧卧位,利用手术显微镜(SXP-1B),通过眶下入路,暴露右侧大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)。选择 MCA 跨越嗅束前部位,利用钝性器械重复刺激 MCA,频率为 100 次/s,持续 30min。

1.3 检测方法

于刺激前、刺激结束时及刺激结束后 0.5h、1h、1.5h 和 2h 应用测微目镜的显微尺测量刺激前后的 MCA 直径的变化。采用激光多普勒血流计的微细探头监测刺激前后的颞叶皮质脑组织灌注指数的变化,显微镜检查 MCA 血管壁和内皮细胞超微结构的改变。以 α -氨基丁酸为内标物,高效液相色谱(HPLC, BECKMAN)法测定 MCA 痉挛血管供血区脑颞叶和枕叶皮质细胞间隙微透析液中的兴奋性氨基酸的浓度。色谱柱为 Kromasil ODS-C₁₈, 250×3.9mm, 粒度 5 μ m。透析液为 Kerbs-Ringer 溶液(138mmol/L NaCl, 11mmol/L NaHCO₃, 5mmol/L KCl, 1mmol/L CaCl₂, 1mmol/L MgCl₂, 1mmol/L NaH₂PO₄, pH7.4)试剂为分析纯。甲醇等为色谱纯。荧光检测器(岛津公司 RF-530)激发波长 360nm, 发射波长 455nm。

1.4 统计学分析

用 SPSS10.0 软件进行 *t* 检验。

表 3 脑血管痉挛发生前后不同时间、不同部位微透析液中 Glu 含量的变化 (nmol/L, $\bar{x} \pm s$, n=6)

	痉挛前	痉挛发生后			
		0.5h	1.0h	1.5h	2.0h
颞叶	102.6±14.0 ^①	6186.7±1295.3	5150.5±1221.3	4986.3±1036.3	4729.8±971.0
枕叶	106.2±15.9 ^②	5789.2±708.2	5092.8±744.7	5046.5±883.6	4320.5±1686.7

①痉挛前与痉挛发生后所有的时间点比较 $P<0.01$, ②颞叶与枕叶所有的时间点比较 $P>0.05$

2 结果

2.1 实验动物的各项生理参数

保持实验动物的各项生理参数基本稳定,血液 pH 值刺激结束后与刺激结束时比较有所下降(表 1),机械性刺激 MCA 后, MCA 直径缩小,激光多普勒仪血流计测定脑血流相对值以 PU 为单位,故以动物自身正常值为 100,缺血脑血流值与自身正常值比较,为刺激前的 68.78%。脑组织灌注指数下降到刺激前的 42.59%。刺激结束后 2h, MCA 直径基本恢复正常。脑组织灌流量恢复到刺激前的 61.87%(表 2)。

2.2 右侧颞叶皮质 HE 染色结果

见图 1。痉挛后 2h,右侧颞叶皮质可见神经元固缩,周围水肿,细胞核不清楚。血管周围水肿,管腔闭塞。星形细胞水肿。

2.3 MCA 内皮细胞超微结构的变化

刺激结束后 2h,电镜显示 MCA 血管内皮细胞染色质聚集(图 2),线粒体嵴消失(图 3)。

2.4 谷氨酸(Glu)含量的变化

Glu 含量在 MCA 血管痉挛发生后急剧升高,但是颞叶与枕叶比较差异无显著性意义(表 3)。

表 1 猫试验期间生理参数 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

	平均血压 (mmHg)	pH	PaCO ₂ (mmHg)	PaO ₂ (mmHg)	体温 (℃)
正常时	135.4±5.8	7.20±0.02	36.7±1.9	104.8±11.7	37.8±0.2
刺激结束时	136.7±5.4	7.21±0.09 ^①	34.0±1.7	103.2±7.7	37.8±0.2 ^①
刺激后					
0.5h	134.9±6.2	7.15±0.03 ^{①②}	37.2±2.1	104.3±11.6	37.7±0.2 ^①
1h	134.5±7.2	7.12±0.08 ^{①②}	39.0±2.2	100.4±8.6	37.6±0.1 ^①
1.5h	134.0±6.1	7.11±0.07 ^{①②}	38.0±1.6	100.8±9.6	37.6±0.1 ^①
2h	128.0±7.9	7.08±0.06 ^{①②}	38.2±2.1	97.3±6.9	37.6±0.1 ^①

①同一指标与正常值比较 $P>0.05$; ②与刺激结束时比较 $P<0.05$

表 2 MCA 直径和颞叶脑组织血液灌注指数变化 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

	MCA 直径		颞叶脑组织血液灌注指数	
	直径(mm)	%	灌注指数	%
正常时	0.897±0.066	100	159.20±23.50	100
刺激结束	0.617±0.129 ^①	68.78	67.80±18.50	42.59
0.5h	0.723±0.082 ^①	80.60	82.50±17.50 ^①	51.82
1h	0.840±0.084 ^②	93.65	89.80±24.00 ^①	56.41
1.5h	0.880±0.072 ^③	98.10	94.00±22.20 ^①	50.05
2h	0.890±0.070 ^③	99.22	98.50±21.00 ^①	61.87

与正常时同一指标比较① $P<0.01$, ② $P<0.05$, ③ $P>0.05$, %是以动物自身正常值为 100,缺血脑血流值与自身正常值比较

3 讨论

缺血瀑布级联效应 (ischemia cascade effects)

是指缺血性卒中神经组织发生一系列的病理及生化反应,如乳酸堆积、自由基释放、细胞内钙超载、兴奋

图1 右侧颞叶皮质 HE 染色结果

图2 MCA 内皮细胞染色质聚集

图3 MCA 内皮细胞线粒体嵴消失或

(13000 倍电镜) 模糊不清 (20000 倍电镜)

性氨基酸增加,炎性过程直至细胞凋亡。血管内皮细胞的功能是神经细胞损伤或修复的基础。在急性机械性 CVS 时,血管内皮细胞是否也会有如神经细胞的缺血瀑布级联效应?尚无明确报道^[1-4]。猫的神经系统发达,为脑回动物,在血管分布、血流及代谢等方面更接近于人。因此,在神经外科研究脑代谢、血流变化、神经保护的影像学研究中,多以猫为对象^[5]。Roy 等^[6]用氢清除率法阻断 MCA 后认为颞叶脑缺血最显著。本文通过机械性刺激 MCA 后,颞叶 CVS,镜下 MCA 直径缩小为刺激前的 68.78%。刺激结束后 2h,MCA 直径恢复正常,但是脑组织血液灌流量的恢复并不与脑血管直径呈正相关。颞叶脑组织灌流指数刺激后下降到刺激前的 42.59%。2h 后脑组织灌流量恢复到刺激前的 61.87%,说明 CVS 不同于脑血管阻断性缺血,也没有明显的再灌注过程。显然与蛛网膜下隙出血、脑卒中^[7]或脑急性重复性缺氧^[8]的病理过程有别。也说明 CVS 后血流量的恢复迟于脑血管直径的恢复,可能和 CVS 时血管壁细胞的病理变化有关。文献记载脑灌注压 70mmHg 时可能发生脑缺血,主要是血管的自主调节功能损伤^[49]。自 Alexander 第一次报道血管痉挛时内皮细胞发生凋亡,认为血管内皮细胞的凋亡是血管痉挛的发病机制^[3]。我们的实验中,HPLC 显示 MCA 供血区脑皮质细胞间隙兴奋性氨基酸急剧升高,颞叶微透析液中谷氨酸的正常浓度为 $102.6 \pm 14.0 \text{ nmol/L}$,枕叶为 $106.2 \pm 15.9 \text{ nmol/L}$ 。CVS 后,Glu 浓度可高达正常的 46 倍。即使刺激结束后 2h,脑组织灌流量恢复到刺激前的 61.87%,谷氨酸浓度依然很高。但是实验表明颞叶与枕叶的兴奋性氨基酸浓度比较差异无显著性意义(表 3)。提示机械性刺激猫脑 MCA,CVS 引发多部位脑组织出现反应。White^[10]认为谷氨酸释放打开 Ca^{2+} 电压门控通道和 Glu 调控通道,激活细胞程序化死亡,线粒体肿胀,嵴断裂。MCA 经急性机械性刺激痉挛后早期电镜结果发现,血管内皮细胞染色质聚集,凝聚成新月形小体,线粒体嵴模糊不清。说明 MCA 内皮细胞在急性机械性刺激痉挛后早期也

会发生缺血瀑布级联效应。血管内皮细胞的结构和功能,是保证神经细胞生存的先提条件。MCA 在急性机械性刺激痉挛后早期可以引发血管内皮细胞的损伤,是诱发内皮细胞凋亡的重要因素,同时加速神经元细胞的凋亡过程。在光镜下显示急性机械性刺激导致 CVS 时,在右侧颞叶皮质血管周围水肿,神经元固缩,神经元坏死,右侧颞叶皮质神经元细胞产生缺血损伤。其病理过程与 Alexander 的叙述不尽相同,但是急性机械性刺激猫脑 MCA 导致 CVS 早期即显示内皮细胞的凋亡,与神经元细胞缺血瀑布级联效应相呼应的结果大相径庭。提示颅脑手术或动物实验中,脑血管痉挛影响术后神经功能的康复。

参考文献

- [1] 王忠诚. 脑血管病及其外科治疗[M]. 第2版. 北京:北京出版社, 1994.110—111.
- [2] 肖福顺,吴中学. 脑血管痉挛活体动物模型[J]. 国外医学·脑血管疾病分册, 2000, 8(6): 334—336.
- [3] Alexander Y, Zubkov, Kataro Ogihara, et al. Apoptosis of endothelial cells in vessels affected by cerebral vasospasm [J]. Surg. Neurol, 2000, 53: 260—266.
- [4] Zhou Changman, Yamaguchi Mitsuo, Colohan Austin RT, et al. Role of p53 and apoptosis in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2005, 25(5): 572—582.
- [5] Sutherland GR, Perron JT, Kozlowski P, et al. AR-R15896AR reduces cerebral infarction volumes after focal ischemia in cats [J]. Neurosurgery, 2000, 46 (3): 710—719.
- [6] Roy MW, Dempsey RJ, Meyer L, et al. Effects of verapamil and diltiazem on acute stroke in cats [J]. J Neurosurg, 1985, 63(6): 929—936.
- [7] Sims NR, Anderson MF. Mitochondria contributions to tissue damage in strokes [J]. Neurochem Int, 2002, 40(6): 511—526.
- [8] 潘颖, 于培兰, 史小冬, 等. 间隔低氧适应与神经细胞过氧化损伤 [J]. 首都医科大学学报, 2003, 24(3): 259.
- [9] 曹勇, 赵继宗. 飞速发展的世界神经外科 [J]. 首都医科大学学报, 2005, 26(4): 376.
- [10] White BC, Sullivan JM, Degracia DJ. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury [J]. J Neuroal Sci, 2000, 179(supple 1-2): 1—33.