

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000005

大鼠蛛网膜下腔出血致脑血管痉挛模型的建立

李英博¹, 竹梅², 陈笛¹, 王莎莉¹

(1. 重庆医科大学神经科学研究中心/生理学教研室, 重庆 400016; 2. 泸州医学院生理教研室, 泸州 646600)

【摘要】目的:应用改良的枕大池二次注血法建立大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)模型。**方法:**成年雄性 SD 大鼠 117 只随机分为假手术组($n=52$)和 SAH($n=65$)模型组, 2 组又随机分为 1、3、5、10 d 和 14 d 组。SAH 组经改良的枕大池二次注血法建立 SAH 模型。假手术组用等量灭菌生理盐水代替非抗凝自体血注入枕大池。观察各组动物自发活动、脑含水量、脑组织学及基底动脉组织学改变。**结果:**与假手术组相比, SAH 各组大鼠自发活动评分在手术后第 3 天明显降低($P=0.001$), 脑含水量在 SAH 后 1 d 明显增加($P=0.000$)。光镜下, SAH 1、3、5 d 组基底动脉管径($P=0.001$)、管腔面积明显减小($P=0.002$), 管壁厚度明显增大($P=0.000$), 差异均有统计学意义。**结论:**应用改良的枕大池二次注血法可以成功建立大鼠 SAH 后 CVS 模型。

【关键词】蛛网膜下腔出血; 脑血管痉挛; 动物模型**【中图分类号】**R743.35**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-06-02

Establishment of subarachnoid hemorrhage induced cerebral vasospasm model of rats

Li Yingbo¹, Zhu Mei², Chen Di¹, Wang Shali¹

(1. Institute of Neuroscience, Teaching and Research Section of Physiology, Chongqing Medical University;

2. Teaching and Research Section of Physiology, Luzhou Medical College)

【Abstract】Objective: To establish a rat model of subarachnoid hemorrhage(SAH) induced cerebral vasospasm by injecting autologous non-heparinised arterial blood into the cisterna magna twice. **Methods:** Totally 117 male SD rats were randomly assigned to sham group($n=52$) and SAH group($n=65$). Rats in the two groups were randomly assigned to 1, 3, 5, 10, 14 d group after the second separation. The SAH model was produced by injecting autologous non-heparinised arterial blood into the cisterna magna twice. Sham operated rats were injected equal volume of physiological saline solution instead of blood according to the same procedure. Mortality, neurological function, brain water content and brain histological were investigated on 1, 3, 5, 10, 14 d following onset of SAH. Wall thickness and mean cross-sectional area of basilar artery(BA) were measured at different time points. **Results:** Compared with those in sham group, neurological scores were reduced in SAH-3d group($P=0.001$). The brain water content was increased in SAH-1d group($P=0.000$). The average diameter($P=0.001$) and cross-sectional area of the BA($P=0.002$) were decreased while the wall thickness was increased($P=0.000$) in SAH-1 d group, SAH-3 d group and SAH-5 d group with statistical differences. **Conclusion:** SAH induced cerebral vasospasm model can be successfully established by injecting autologous non-heparinised arterial blood into the cisterna magna twice, which model is applicable to study neurological damage and drug intervention following SAH.

【Key words】subarachnoid hemorrhage; cerebral vasospasm; animal model

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是最常见的脑血管意外。自 1951 年 Ecker 等报道 SAH 后出现脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)现

象后,人们逐渐发现 CVS 是 SAH 后的最严重并发症之一, CVS 一旦发生,往往继发性、进行性加重缺血性脑损害,甚至导致脑梗死,成为致死和致残的主要原因。CVS 的治疗被认为是降低 SAH 后患者的死亡率和发病率的关键^[1-2]。因此成功建立能够模拟人类 SAH 后 CVS 病理发展的动物模型是深入研究其发病机制,寻找有效治疗策略与药物干预的最基本要求,对改良和完善 SAH 后 CVS 模型,有着重要

作者介绍:李英博, Email: xiaosui19781127@163.com,

研究方向:脑血管疾病。

通信作者:王莎莉, Email: ypsali@gmail.com。

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(编号:81100453)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150127.1504.003.html>

(2014-03-18)

的基础研究和临床应用意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物

体质量 240~300 g 的 117 只健康成年雄性 SD 大鼠,购自 XX 实验动物中心,被随机分为假手术组($n=52$)和 SAH 模型组($n=65$)。2 组又随机分为 1、3、5、10 d 和 14 d 组。SAH 组经改良的枕大池二次注血法建立 SAH 模型。假手术组用等量灭菌生理盐水代替非抗凝自体血注入枕大池。

1.2 实验方法

10%水合氯醛(350~400 mg/kg,腹腔注射 ip.)麻醉大鼠,仰卧位固定,吸痰,暴露分离股动脉穿线备用。然后将大鼠俯卧位固定在大鼠脑立体定位仪上,暴露寰枕膜。用 27-gauge 针头行枕大池穿刺,有突破感后抽出约 0.1 ml 脑脊液。从左侧股动脉取自体非抗凝动脉血(0.1 ml/100g)缓慢注入枕大池。注血后,将大鼠头向下,置于 -30° 倾角的斜面上,留针 30 min 以防止血液渗漏。拔针后骨腊封闭穿刺点,逐层缝合肌层、皮肤,于麻醉苏醒后送回笼中。首次注血 48 h 后,重复上述手术过程,第 2 次注血 0.2 ml/只,建模完成。假手术组动物用灭菌生理盐水代替自体非抗凝动脉血注入枕大池。术中和术后 3 h 内死亡的大鼠 13 只,视为麻醉或手术意外所致,不计入统计。

1.3 观察指标

1.3.1 颅脑大体解剖学观察 2 次手术后 2 h,在假手术组和 SAH 组各取 2 只大鼠经 10%水合氯醛(500 mg/kg 体质量)深麻醉后取出完整脑组织拍照,观察大鼠脑基底池的血液分布情况。

1.3.2 自发活动评分 将实验大鼠置于一宽敞、可以自由活动、四壁均可触及的笼中行自发活动评分。由 2 位实验人员分别以双盲法于术前 1 d 和术后每天对实验大鼠进行评价和记录,直至动物被处死之日,取 2 组均值为最后得分。自发活动评分根据动物精神状态及运动情况分为 4 级:1 级,大鼠活动正常,无活动障碍,积极探索四周环境,至少触及三面笼壁的上缘;2 级,轻度活动障碍,即大鼠精神差、嗜睡,行动有一定的延迟,没有到达所有的笼壁,但它至少触及一面笼壁的上缘;3 级,中度活动障碍,即大鼠几乎不能站立,在笼中几乎不进行活动;4 级,重度活动障碍,即老鼠没有动弹,并显示有肢体的瘫痪。第 1 和第 2 次注血时间分别记为-2 d 和 0 d。

1.3.3 脑含水量测定 分别于 SAH 造模后 1、3、5、10 d 和 14 d 各相应时间点处死大鼠($n=5$),迅速取出大脑和小脑,用滤纸吸去表面血液。用电子天平分别称取大脑和小脑的质量(湿重),然后将脑组织置于烤箱中, 105°C 中烘烤至恒重,再次称取大脑和小脑的质量(干重)。脑组织含水量的计算公式为:脑组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$ 。其中小脑组织的含水量作为正常对照。

1.3.4 脑组织及基底动脉病理学检测 分别于 SAH 造模后

1、3、5、10 d 和 14 d 处死大鼠($n=5$),取出脑组织及基底动脉经 4%多聚甲醛后固定 24 h 后,常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋,制成石蜡块。将包埋好的石蜡块置于切片机上连续冠状面切片,厚约 5 μm 。HE 染色,光镜下观察脑组织和基底动脉组织病理学改变。

1.3.5 基底动脉管径、管腔面积及管壁厚度的测量 将上述各组基底动脉的组织切片行 HE 染色,光学显微镜下观察照相后,参照文献[3]的方法,采用 image pro-plus6.0 图像分析系统测量基底动脉的管径、管腔面积和管壁厚度。管腔面积的测量方法如下:沿基底动脉内表面测定其管腔周长(L),再根据公式:直径(d)= L/π 计算管腔直径,半径(r)= $L/2\pi$ 计算管腔半径,管腔面积(S)根据公式: $S=\pi r^2$ 求得。管壁厚度的测量方法如下:测量基底动脉内表面至中膜外缘之距,不包括外膜。每根血管选取 4 个不同的检测点测量管壁厚度,取其均值作为该血管的测定值。

1.4 统计学方法

所有数据均采用 SPSS17.0 统计软件包进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间采用单因素方差分析;组间两两比较,方差齐者用 student-newman-keuls 检验。2 组间比较用独立样本 t 检验法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

SAH 组大鼠在第 1 次注血后精神萎靡、嗜睡、活动减少、饮食饮水量减少、体质量减轻、自洁情况差、反应迟缓,2 次注血后上述情况加重,以次日为著,以后逐渐缓解。假手术组大鼠在手术当天亦表现为精神萎靡、活动减少、饮食饮水量减少、体质量减轻等,但程度较轻,且很快恢复至术前状态。

2.2 颅脑大体解剖学观察

假手术组脑基底池未见血液分布,SAH 组大鼠脑基底池可见大量血液和血凝块弥漫分布,主要聚集在蝶鞍、后颅窝和基底池,包绕脑底部主要血管和基底动脉周围(图 1)。

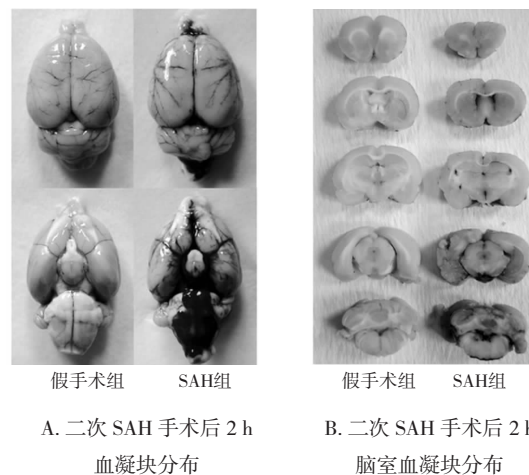


图 1 脑大体观察

Fig.1 Gross observation of brain

2.3 自发活动评分

手术后,SAH 组大鼠神经功能损伤症状以 2 次注血的当日(下图中的-2 d 和 0 d 分别为第 1 和第 2 次注血时间)最重,自发活动评分最高,大多数出现反应淡漠,运动减少,偏瘫,次日随时间推移症状逐渐缓解,评分逐渐降低。假手术组大鼠症状较轻,到第 10 天时已恢复到注血前水平。其中假手术组在第 0 天自发活动评分为 3.000 ± 0.782 ,而 SAH 组为 3.650 ± 0.474 ,差异有统计学意义($P=0.000$);同样,在 SAH 后第 3 天,假手术组为 1.350 ± 0.580 ,而 SAH 组为 1.800 ± 0.422 ,差异也有统计学意义($P=0.001$)(图 2)。

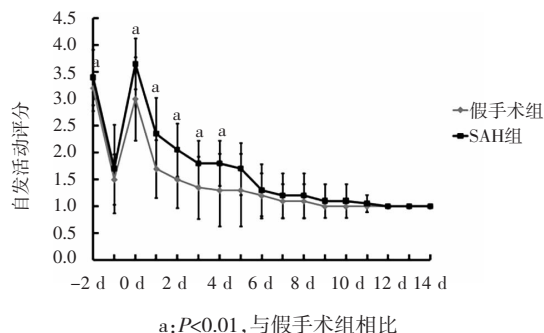


图 2 自发活动评分

Fig.2 Spontaneous activity scores

2.4 脑含水量比较

2次注血手术后,SAH 组大鼠大脑组织含水量较假手术组明显增加,SAH-1 d 组脑含水量达高峰,SAH-3 d 组仍维持在高水平,以后逐渐下降。其中,SAH-1 d 时,假手术组为 $(78.41 \pm 0.27)\%$,SAH 组为 $(79.49 \pm 0.29)\%$,差异有统计学意义($P=0.000$);在 SAH-3 d 时,假手术组为 $(78.13 \pm 0.40)\%$,SAH 组为 $(78.66 \pm 0.30)\%$,差异有统计学意义($P=0.007$)。在其他时间点,假手术组与 SAH 组没有统计学差异($P>0.05$)(图 3A)。各时间点 SAH 组和假手术组大鼠的小脑含水量均无统计学差异(图 3B)。

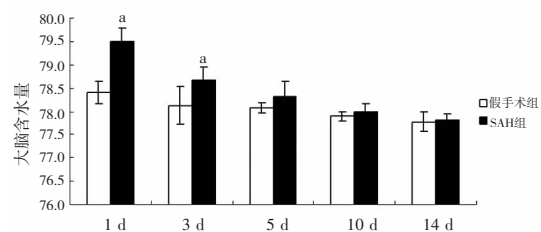


图 3A 大脑含水量

A. 大脑含水量

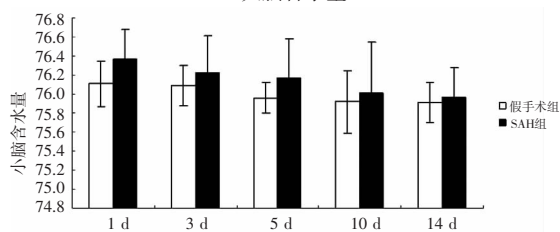


图 3B 小脑含水量

B. 小脑含水量

图 3 大小脑含水量

Fig.3 Cerebellum brain water content

2.5 脑组织形态学检查

假手术组大鼠脑组织神经元排列整齐,结构正常,细胞膜边缘清楚,细胞核呈圆形,染色质在核内分布均匀,呈空泡状核仁清晰可见。SAH-1 d 组大鼠脑组织可见神经元数目减少,神经元水肿变性,细胞核肿胀,核周间隙增宽,部分神经元深染、凝集,胞质浓缩,核固缩。SAH-3 d~14 d 组大鼠脑组织结构破坏加重,神经元数目明显减少,出现大量核固缩(图 4)。

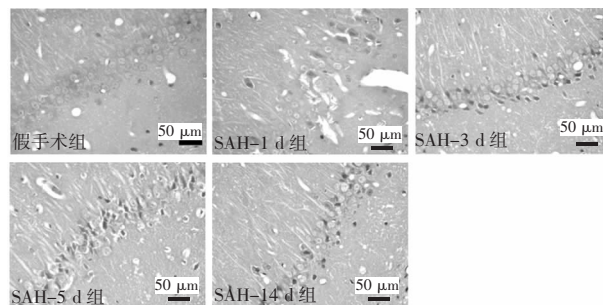


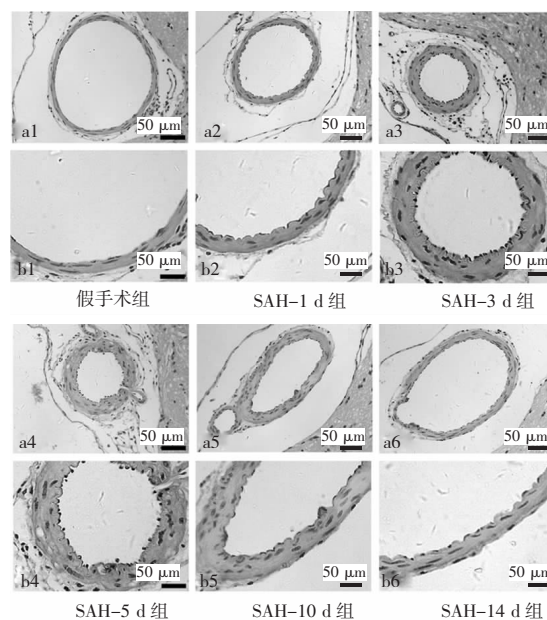
图 4 SAH 手术后海马 HE 染色 (400 ×)

Fig.4 HE staining of hippocampus after SAH (400 ×)

2.6 基底动脉的形态变化

通过光学显微镜观察,HE 染色显示假手术组大鼠基底动脉结构正常,管腔呈圆形或椭圆形,管腔较大,管壁无增厚,内弹力膜和内皮结构完整,无皱褶、断裂。

SAH-1 d 组大鼠出现明显痉挛。SAH-3 d 组大鼠基底动脉的痉挛加重,SAH-5 d 达高峰,SAH-10 d 组大鼠的基底动脉痉挛有所缓解,但仍可见管腔缩小、内弹力膜波浪样皱褶和平滑肌层增生。SAH-14 d 组大鼠基底动脉的病变明显减轻,管腔变大,管壁变薄;内皮细胞排列趋于平整,内弹力膜皱褶基本消失(图 5)。



HE染色, a1~a6:400 × ; b1~b6:1 000 ×

图 5 SAH 手术后的基底动脉

Fig.5 Basilar artery after SAH

2.7 基底动脉管径、管腔面积和管壁厚度的测量结果

SAH-1 d~5 d 组大鼠基底动脉管径和管腔面积减小,管壁增厚,其中尤以第 5 天时差异最为明显。SAH-5 d 时,假手术组基底动脉管径为(257.249 ± 24.380) μm ,SAH 组为(94.388 ± 31.409) μm ,差异有统计学意义($P=0.001$)。此时,假手术组管腔面积为($52\,322.330 \pm 9\,727.560$) μm^2 ,而 SAH 组为($7\,613.260 \pm 4\,430.700$) μm^2 ,面积减小明显,差异有统计学意义($P=0.002$)。而同时,假手术组管壁厚度为(16.774 ± 0.809) μm ,而 SAH 组为(43.993 ± 5.369) μm ,管壁增厚明显,差异有统计学意义($P=0.000$)。SAH-14 d 组大鼠基底动脉的管径、管腔面积和管壁厚度基本恢复,与假手术组相比差异无统计学意义($P>0.05$) (图 6)。

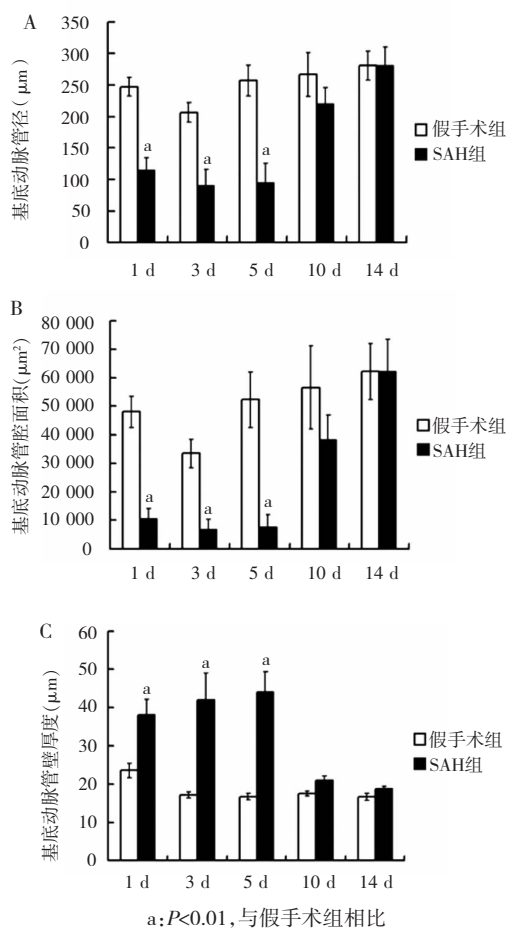


图 6 SAH 手术后基底动脉的管径、管腔面积和管壁厚度

Fig.6 Diameter, cross-sectional area and thickness of basilar artery after SAH

3 讨论

SAH 后 CVS 的动物模型是研究其发病机理、病理与病理生理变化、判定药物疗效及治疗策略必要的实验手段。理想的 SAH 后 CVS 动物模型应符合以下要求:①能模拟临床 SAH 后 CVS 的发展过程,

具有与人类 CVS 相似的症状;②在蛛网膜下腔中有足够量的血凝块并可控制 CVS 的程度;③可耐受治疗方法和进行慢性实验;④制作方法简单,重复性高,价格低廉,能在短期大批量制作。自 Bagley 等 1928 年首次采用狗作 SAH 模型以来,人们一直在寻找合适的动物和方法,模拟出人类蛛网膜下腔出血的临床发病过程。在所有的实验动物中,大鼠模型因其性价比高,并能较好的反应蛛网膜下腔出血而得到广泛的认同。

在大鼠 SAH 模型的制备中,比较成熟的方法有^[4-5]:①血管内穿刺法;②脑池内注血法,此法包括:视交叉池注血法,经颞顶部蛛网膜下腔注血法;③枕大池注血法。枕大池注血法最大优点是形成的血凝块可很好地包绕于基底动脉周围,造成明显的 CVS,经此方法建立的 SAH 模型报道最多。枕大池注血法又包括枕大池单次注血法和枕大池二次注血法 2 种。在枕大池单次注血动物模型中,并不能成功模拟临床 SAH 后 CVS 的两阶段现象,这可能是蛛网膜下腔内形成的血凝块与颅底血管接触时间过短所致。Ono 等^[6]在实验中发现:大鼠仅在枕大池单次注血后第 1 天出现剧烈的 CVS,随后 CVS 的程度逐渐减轻,因此这一模型多用于 SAH 后急性 CVS 的研究。后来有学者通过加大单次注血的量,产生了类似 CVS 的 2 个阶段现象,但也增加了动物在此过程中的死亡率。枕大池二次注血法是指第 1 次注血 48 h 后重复注入等量自体非抗凝动脉血。研究发现:第 1 次注血后形成的血凝块能阻碍脑池内脑脊液的循环,为第 2 次注血后血凝块能持续与颅底血管接触创造了条件。Lee 等^[7]用枕大池二次注血法制备 SAH 模型证实,在第 1 次注血后 24 h 开始出现 CVS,至第 2 次注血后 5~8 d 基底动脉持续痉挛达高峰,然后缓解。此病理改变过程与人类 SAH 后的 CVS 类似。

本研究在用枕大池二次注血法制备 SAH 模型时作了以下调整:①注血量和注血时间^[8-10]。一般注血量在 0.07~0.5 ml 之间,注射速度在 30 s~10 min 不等。由于注血量在 0.2 ml 以下时不易产生 CVS,注血量超过 0.3 ml 又容易因颅内压过高导致动物死亡。故研究中调整首次注血量为 0.1 ml/100 g 体质量,第 2 次注血量调整为 0.2 ml/只,这样既可以避免颅内高压所致的动物死亡,又可以成功建立 SAH 模型。而注血时间则控制在 2 min 左右,以避免注血过快所导致枕骨大孔疝,注血过慢血液在注射器中凝结。注血后用骨蜡封闭穿刺点防止血液外

渗。②使用恒温手术台和室温在 24℃~26℃保证动物在造模过程中的体温恒定,大大减少了由于实验中温度过低引起的动物死亡。③麻醉后给大鼠吸痰,避免大鼠在手术中因分泌物堵塞气道窒息死亡。④注血过程中密切监测动物的呼吸一旦在术中出现呼吸骤停,则及时进行心肺复苏。用此法制备的 SAH 模型的死亡率低(假手术组共计 52 只,死亡 2 只;SAH 组共计 65 只,死亡 15 只),方法简单稳定,重复性好,但是否达到实验预期的要求,造成模型大鼠脑损伤和早发以及迟发性 CVS,则通过观察 SAH 后第 1 天至第 14 天动物的脑损伤及血管痉挛以及脑水含量和行为学等的动态变化。

SAH 后 2 h 颅脑大体解剖发现血液及血凝块主要分布于蝶鞍、后颅窝和基底池,包绕脑底部主要血管和基底动脉周围,这基本符合本研究的前期预想。神经元的损伤与凋亡是 SAH 后非常重要的病理指标,而海马 CA1 区神经元对缺血具有选择性敏感,短暂性脑缺血即可导致该区神经元的迟发性死亡,所以海马成为缺血性脑损伤研究的一个典型的脑区。本实验脑组织 HE 染色显示,在 2 次注血后 1 d 已出现海马神经元凋亡,第 5 天脑组织海马区正常神经元明显减少,多数神经元深染、固缩,胞浆中出现空泡,提示 SAH 导致的神经元的损伤在发生早程度重,并与出血时间和 CVS 程度正相关。CVS 是 SAH 后的最严重并发症之一,CVS 一旦发生,往往继发性进行性加重缺血性脑损害,甚至导致脑梗死,成为致死和致残的主要原因,所以脑血管痉挛程度是评价 SAH 预后的重要指标之一。而目前公认的脑血管痉挛程度判定指标,是测量脑血管内径周长、血管壁厚度及超微结构的改变。检测本模型的基底动脉组织学变化发现,SAH 后 1 d 其管壁增厚,管径与管腔面积减小,说明此时已出现脑血管痉挛,到 5 d 时痉挛最严重,以后逐渐缓解,第 14 天时,与基本恢复到对照水平。进一步观察发现,基底动脉痉挛发生的时间和程度与内皮细胞凋亡发生的时间和程度正相关,也与其他学者报道的结果以及临床上 CVS 发生的时间窗基本一致。综合上述数据,SAH 后 5 d 的改变最为显著,提示此模型能够较好的模拟人类 SAH 后 CVS 和脑损伤的动态变化过程。

在模型的评价与鉴定中,研究还观察了实验动物的脑水含量和自发活动改变。脑水含量能客观反应脑水肿程度,与小脑组织相比,在 SAH 后大脑组织的脑水含量明显增多,特别是在 2 次出血后的当

天更为显著,提示 SAH 还引起了急性脑水肿发生,这无疑可以加重神经元的损伤与脑血管的痉挛,加重脑功能的损伤。在出血当天至第 6 天实验动物出现明显的行为学障碍,其自发活动评分与假手术组相比都有统计学差异,说明上述的病理改变也导致了实验动物的行为学的异常改变。

改良的枕大池二次注血法建立的大鼠 SAH 后 CVS 模型,不但方法简单、稳定、重复性好,而且经神经行为学评分、脑组织水含量检测和脑组织学观察等提示:该模型导致了脑组织严重的损伤,经基底动脉组织学观察和管径、管腔面积和管壁厚度测量证实,该模型诱发了早期和迟发性的 CVS,其病理变化与人类相似,与文献报道相吻合。故本模型是研究 SAH 后脑损伤和/或 CVS 发病机制,病理生理改变和治疗效果的较理想的动物模型。

参 考 文 献

- [1] Ulrich CT, Fung C, Vatter H, et al. Occurrence of vasospasm and infarction in relation to a focal monitoring sensor in patients after SAH: placing a bet when placing a probe[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62754.
- [2] Ostrowski RP, Zhang JH. Hyperbaric oxygen for cerebral vasospasm and brain injury following subarachnoid hemorrhage[J]. Transl Stroke Res, 2011, 2(3): 316-327.
- [3] Li Y, Tang J, Khatibi NH, et al. Ginsenoside RB1 reduces neurologic damage, is anti-apoptotic and down-regulates p53 and BAX in subarachnoid hemorrhage[J]. Curr Neurovasc Res, 2010, 7(2): 85-94.
- [4] Pluta RM, Skopets B, Kralik JD. Relevance of animal models of subarachnoid hemorrhage for examining neurobehavioral changes[J]. Acta Neurochir Suppl, 2013(115): 225-232.
- [5] Titova E, Ostrowski RP, Zhang JH, et al. Experimental models of subarachnoid hemorrhage for studies of cerebral vasospasm[J]. Neurol Res, 2009, 31(6): 568-581.
- [6] Ono S, Date I, Onoda K, et al. Time course of the diameter of the major cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage using corrosion cast technique[J]. Neurol Res, 2003, 25(4): 383-389.
- [7] Lee JY, Huang DL, Keep R, et al. Characterization of an improved double hemorrhage rat model for the study of delayed cerebral vasospasm[J]. J Neurosci Methods, 2008, 168(2): 358-366.
- [8] Jeon H, Ai J, Sabri M, et al. Neurological and neurobehavioral assessment of experimental subarachnoid hemorrhage[J]. BMC Neurosci, 2009(10): 103.
- [9] Raslan F, Albert-Weinberger C, Westermaier T, et al. A modified double injection model of cisterna magna for the study of delayed cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Exp Transl Stroke Med, 2012, 4(1): 23.
- [10] Muñoz-Sánchez MA, Egea-Guerrero JJ, Revuelto-Rey J, et al. A new percutaneous model of Subarachnoid haemorrhage in rats[J]. J Neurosci Methods, 2012, 211(1): 88-93.

(责任编辑:唐宗顺)