

一种兔脑血管痉挛模型的建立

柏鲁宁, 周雄波, 赵晓平, 郭强, 范小璇
(陕西中医学院附属医院神经外一科, 陕西 咸阳 712000)

[摘要] 目的: 建立一种结果可靠而制作简单的蛛网膜下隙出血(SAH)后脑血管痉挛(CVS)动物模型。方法: 实验动物分为对照组与模型组, 采用枕大池2次注血法建立 CVS 动物模型, 通过尸体解剖和脑血管造影观察基底动脉(BA)痉挛。结果: 尸体解剖模型组 BA 周围和枕大池内均有血凝块; 造影发现模型组中 day3、5 组与对照组比有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 枕大池2次注血法是建立 CVS 动物模型的一种可靠方法。

[关键词] 蛛网膜下隙出血; 脑血管痉挛; 动物模型

[中图分类号] R651.15 [文献标识码] A [文章编号] 1007-4716(2008)04-0199-03

An Experimental Model of Cerebral Vasospasm in Rabbits

BAI Lu-ning, ZHOU Xiong-bo, ZHAO Xiao-ping, GUO Qiang, FAN Xiao-xuan

(Department of Neurosurgery, Accidental Hospital of Shanxi University of Chinese Medicine, Xi'an Yang 721000, China)

[Abstract] Objective: To establish a simple and reliable model of cerebral vasospasm (CVS). Method: The subjects were randomly divided into control group and CVS group. "Two-hemorrhage" method was used to establish the rabbit model. By the autopsy and the cerebral angiography, the CVS of basilar artery (BA) was observed. Results: In the CVS group, the blood clot could be seen around BA and in cisterna magna. Compared with the control group, the calibre of BA in the day3 and day5 groups became thin ($P < 0.05$). Conclusion: "Two-hemorrhage" is a simple and reliable method for establishing model of CVS in rabbits.

[Key Words] subarachnoid hemorrhage, cerebral vasospasm, animal model

人体动脉瘤破裂所致蛛网膜下隙出血(SAH)后脑血管痉挛(CVS)只能通过尸体解剖来观察。许多SAH和血管痉挛动物模型因此而建立。较理想的动物模型血管收缩可由血管造影证实, CVS发展和恢复时间规律应与所观察的人血管相似^[1]。本实验用兔, 经枕大池两次注入非抗凝动脉血所致SAH后CVS的动物模型, 拟为SAH后CVS发生机制的研究建立可靠的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验分组

日本大耳白兔(西安交通大学医学院动物中心提供)20只, 体质量2.3~3.0 kg, 平均2.8 kg, 雌雄不限, 雌兔未孕。实验动物分为对照组(5只)和模型组(又分day1、3、5、8组, 每组5只); 对照组只行枕大池2次穿刺, 模型组按枕大池2次注血法造模; 两组分别在第2次穿刺后1、3、5、8 d行椎动脉造影, 之后快速处死并尸体解剖。

1.2 建模

用体积分数25%的乌拉坦(3 mL/kg)耳缘静脉麻醉, 兔左侧卧位固定, 保持呼吸道通畅。兔枕部剃毛, 消毒后于枕部中线做一直切口(长2.5 cm), 钝性分离直达寰枕筋膜, 充分显露寰枕部, 左手拇指指尖感觉寰枕筋膜, 以其为定位标志, 其余4指固定兔头, 右手持9号腰椎穿刺针与躯体成角约30°穿刺枕大池, 有突破感后退出针芯, 此时可见清亮脑脊液流出。由兔耳中央动脉取非抗凝血2.5 mL缓慢注入枕大池内, 退出套管针, 局部压迫后缝合切口。取侧卧位, 头低30°, 保持该体位30 min, 使血液积在脑基底池。首次注血后48 h, 由兔耳中央动脉再次取非抗凝血2.5 mL按上述方法再次注入枕大池。

收稿日期: 2008-09-27

作者简介: 柏鲁宁(1979-), 男, 甘肃省天水市人, 硕士, 主治医师, 主要从事颅脑损伤的基础研究与临床工作。

1.3 选择性脑血管造影

Cordis 3F MASSTRANSIT 微导管盒(强生公司, 美国)和飞利浦数字减影机(西门子公司, 德国)进行兔选择性脑血管造影。分离兔股动脉, 直视下穿刺, X 线下将导管和导丝送入锁骨下动脉开口, 快速注入造影剂, 基底动脉(BA)能较好显影, 而颈内动脉系统不显影。

1.4 BA 管径测量

将造影片上每条 BA 分 3 等分, 取每分中心点在放大镜下放大 10 倍后测量, 然后取其平均数(mm)。

1.5 统计学处理

均数用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS12.0 进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 动物存活情况

两组死亡 3 只(1 只在麻醉后猝死, 1 只在注血时反复穿刺 3 次, 于第 2 次注血后 3 d 死亡。1 只在行枕大池穿刺时, 见暗红色血性脑脊液流出, 拔出穿刺针后出现颈项强直, 四肢抽动后死亡; 尸体解剖见颅内蛛网膜下隙有大量暗红色血凝块, BA 周围有大量血凝块, 可能系穿刺时损伤静脉窦)。

2.2 尸体解剖和血管造影结果

尸体解剖: 模型组 BA 周围和枕大池内均有血凝块, 其中 day1、3 组 BA 周围被大量血凝块包绕; day8 组血凝块明显减少; 对照组 BA 周围和枕大池内均无血凝块。脑血管造影: 模型组 BA 管径粗细不均, 造影剂显影不均匀(图 2~5, 封 3), 其中 day3、5 组痉挛最明显, BA 终末支大脑后动脉闭塞(图 3, 4, 封 3); 对照组 BA 管径粗细均匀, 造影剂显影均匀, BA 终末支大脑后动脉显影(图 1, 封 3)。测量其平均值发现 day3、5 组痉挛程度最严重, 与对照组比有统计学意义($P < 0.05$), day8 组痉挛程度有所缓解(表 1)。

表 1 CVS 中 BA 管径(mm, $\bar{x} \pm s$)变化

Table 1 The calibre of the BA in CVS

项目	对照组	模型组			
		day1 组	day3 组	day5 组	day8 组
BA	0.64 ± 0.025	0.61 ± 0.026	0.56 ± 0.021 ¹⁾	0.48 ± 0.046 ¹⁾	0.58 ± 0.025

与对照组比 1) $P < 0.05$

3 讨论

SAH 后 CVS 是患者致死、致残的主要原因^[2]。动物模型建立后, 通过实验动物使治疗方法的有效性和毒理研究成为可能。而理想的模型, 实验动物应尽可能接近人类, 所造成的 SAH 最接近于动脉瘤破裂, 应同时具备容易制做且花费少等特点^[3]。用作活体颅内模型的动物主要有大鼠、兔、猫、猪、狗和猴。其中, 灵长类和犬类是首选动物。因为在这类动物中, 迟发性 CVS 的发展时序和人类相似, 且行脑血管造影较容易; 然而, 这类动物的缺点是费用高, 可行性低, 复制 SAH 模型困难。因此, 根据以上几个要求, 在 CVS 的研究中, 兔子成了一个可供选择的种类: ①在 SAH 后 CVS 的发展时序中, 兔已被证明表现为双时相: 早期 CVS 和迟发性 CVS。此过程与人类 CVS 的发展时序相似; 而且, 此特点好于猫科动物; ②在兔的 CVS 模型中, 动脉形态、脑室和脉络丛的改变与人类相似。兔模型优于灵长类和犬类的另一点是可以大规模饲养, 费用低, 易于管理^[4]。

枕大池 2 次注血法被广泛采用^[5]。本实验发现, 第 2 次注血 1、3 d 后, BA 周围有大量血凝块, 5 d 后逐渐减少; 脑血管造影可见 BA 管径粗细不均, 造影剂显影不均匀, 脑桥支和终末支(大脑后动脉)闭塞, 第 2 次注血后 5 d 痉挛程度最严重, 而对照组 BA 管径粗细均匀, 造影剂显影均匀, 脑桥支和终末支正常显影。第 2 次注血后 day3、5 组 BA 管径与对照组比有统计学意义($P < 0.05$), 提示枕大池 2 次注血法是建立 CVS 动物模型的一种可靠方法。

本法优点: ①血凝块可很好地包绕于 BA 周围, 造成明显的 CVS。脑底大血管周围凝血块的存在是产生迟发性脑血管痉挛的根本条件。血凝块少只能诱发短暂的血管痉挛, 几天后就自动缓解。FISHER 等^[6]认为 CVS 发生率和程度与蛛网膜下隙积血量成正比。且其血管收缩可由血管造影证实, 与人类相似。②操作相对简单, 关键是枕大池穿刺, 反复穿刺可明显加重症状。充分显露寰枕部后, 反复活动其寰枕关节, 使左手拇指指尖充分感觉寰枕筋膜, 以其为定位标志是穿刺的要领。③可以控制出血速度及出血量, 动物死亡率低、效果确切、重复性好。缺点: ①兔的蛛网膜下隙高度仅 3~6 mm, 易伤脑干^[7]。②人脑动脉瘤破裂造成的 SAH, 其中 85% 的动脉瘤来自 Willis (下转第 204 页)

高, IP 能够明显的降低丙二醛质量浓度, 提高超氧化物歧化酶活性, 说明 IP 通过清除氧自由基达到减轻炎症损害是其抗炎作用的重要机制之一。

结果表明, IP 可以全方位的抑制炎症的发展, 正丁醇作为 IP 的粗提物即显示了较强的抗炎活性, 本实验中 400 mg/kg 具有和阳性对照药布洛芬和地塞米松同等或近似的效价, 说明 IP 在药效学方面将有良好的研发前景, 继续分离有效部位所得出的成分将可能有更强的抗炎活性。上述急、慢性炎症的形成与多种炎症介质有关(组织胺、5-羟色胺、激肽、前列腺素合成酶及前列腺素等), 它们共同的作用导致了炎症的发生与加重, 我们将进一步研究 IP 对这些因子的影响, 了解它的作用机制, 为将 IP 开发成为高效低毒的抗风湿炎症与镇痛的药物打下坚实的药效学基础。

参考文献:

- [1] QIU H X. Notes relating to the flora of southern China(3) IV. CORRECTIONS TO SOME SPECIES OF CONVULVULACEAE CNKI; SUN; GXZW. 0. 1995-01-003
- [2] OLAJIDE O A, AWE S O, MAKINDE J M, et al. Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Alstonia boonei* stem bark[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 71: 179-186.
- [3] WINTER C A, RISKEY E A, NUSS C W. Carrageenan induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-in-

flammatory drugs[J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1962, 111: 544-547.

- [4] WINTER C A, PORTER C C. Effect of alteration in side chain upon anti-inflammatory and liver glycogen activities in hydrocortisone esters[J]. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 1957, 46: 515-519.
- [5] MIKAMI T, MIYASAKAI K. Effect of several anti-inflammatory drugs on the various parameters involved in the inflammation response in rat carrageenan induced pleurisy[J]. *European Journal of Pharmacology*, 1983, 95: 1-12.
- [6] 洪美玲. 病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 50.
- [7] 杜冠华, 李学军, 张永祥, 等译. 药理学实验指南——新药发现和药理学评价[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 529-539.
- [8] 徐叔云, 卞如镰, 陈修. 药理实验方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 713-723.
- [9] FERREIRA S H, MONCADA S, VANE J R. Prostaglandins and the mechanism of analgesic produced by aspirin-like drug [J]. *Ann Rev Pharmac*, 1974, 14: 57.
- [10] 徐叔云, 卞如镰, 陈修. 药理实验方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 918.
- [11] 黄国平, 马传庚, 徐叔云, 等. 维拉帕米、硝苯吡啶和粉防己碱加强叫垛美辛的镇痛作用[J]. *中国药理学通报*, 1993, 9(1): 26-28.
- [12] 梁君山. 巨噬细胞“呼吸爆发”反应的激活机制[J]. *中国药理学通报*, 1990, 6(4): 201-204.

(上接第 200 页)

环的前循环^[8], 而本法主要用于研究 Willis 环后部 CVS 的变化, 此与人类发病率不符。

总之, 枕大池 2 次注血法是建立 CVS 动物模型的一种可靠方法, 但还不能完全模拟人类 CVS 的病理生理特征。因此, 寻找和建立一种趋于完美的 SAH 动物模型, 已成为迫切需要解决的问题。

参考文献:

- [1] MACDONALD R L. Cerebral vasospasm[J]. *Neurosurg Q*, 1995, 12(5): 73-97.
- [2] SHIGERU N, ISMAIL L. Signaling Mechanisms in Cerebral Vasospasm[J]. *TCM*, 2005, 15(1): 24-34.
- [3] 赵振伟, 高国栋, 赵继培, 等. 蛛网膜下隙出血后脑血管痉挛的影像学和组织化学研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(1): 98-99.
- [4] MENG L Z, JI X S, JIA Q Z, et al. Comparison between one

and two-hemorrhage models of cerebral vasospasm in rabbits [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2007, 159(2): 318-324.

- [5] 陈克非, 史继新. 蛛网膜下隙出血活体动物模型的研究进展[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2006, 11(1): 43-45.
- [6] FISHER C M, KISTLER J P, DAVIS J M. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning[J]. *Neurosurgery*, 1980, 6: 129.
- [7] 施国君, 高国栋, 刘俊雄, 等. 一种新的兔症状性脑血管痉挛模型的建立[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2001, 18(6): 350-352.
- [8] KASSELL N F, TORNER J C, HALEY E C J, et al. The international cooperative study on the timing of aneurysm surgery Part I: overall management results[J]. *J Neurosurg*, 1990, 73(1): 18-36.

一种兔脑血管痉挛模型的建立

(正文见第199页)

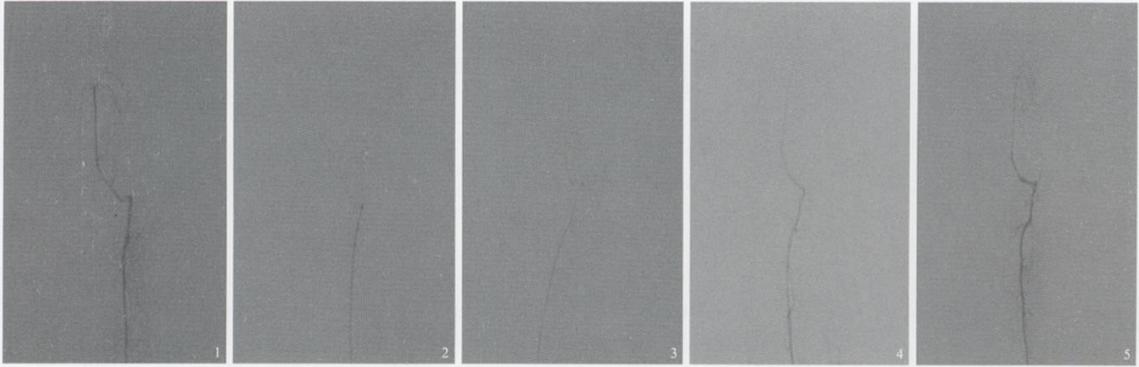


图1 对照组椎动脉和BA管径粗细均匀,造影剂显影均匀,大脑后动脉显影。图2 第2次注血后第1 d, BA管径粗细不均,造影剂显影不均;大脑后动脉显影,但模糊不清。图3 第2次注血后第3 d, BA管径粗细不均,造影剂显影不均;大脑后动脉未显影。图4 第2次注血后第5 d, BA管径粗细不均,造影剂显影不均;大脑后动脉未显影。图5 第2次注血后第8 d, BA管径粗细不均,造影剂显影不均;大脑后动脉显影,但模糊不清

Fig.1 The caliber of vertebral artery and BA were evenness, the posterior cerebral artery was visualized in the control group. Fig.2 The first day after "twohemorrhage", the caliber of BA was unevenness, the posterior cerebral artery was visualized, but blunted. Fig.3 The third day after "twohemorrhage", the caliber of BA was unevenness, the posterior cerebral artery was not visualized. Fig.4 The fifth day after "two hemorrhage", the caliber of BA was unevenness, the posterior cerebral artery was not visualized. Fig.5 The eighth day after "twohemorrhage", the caliber of BA was unevenness, the posterior cerebral artery was visualized, but blunted

D2-40标记的微淋巴管密度与直肠癌淋巴转移的关系

(正文见第212页)

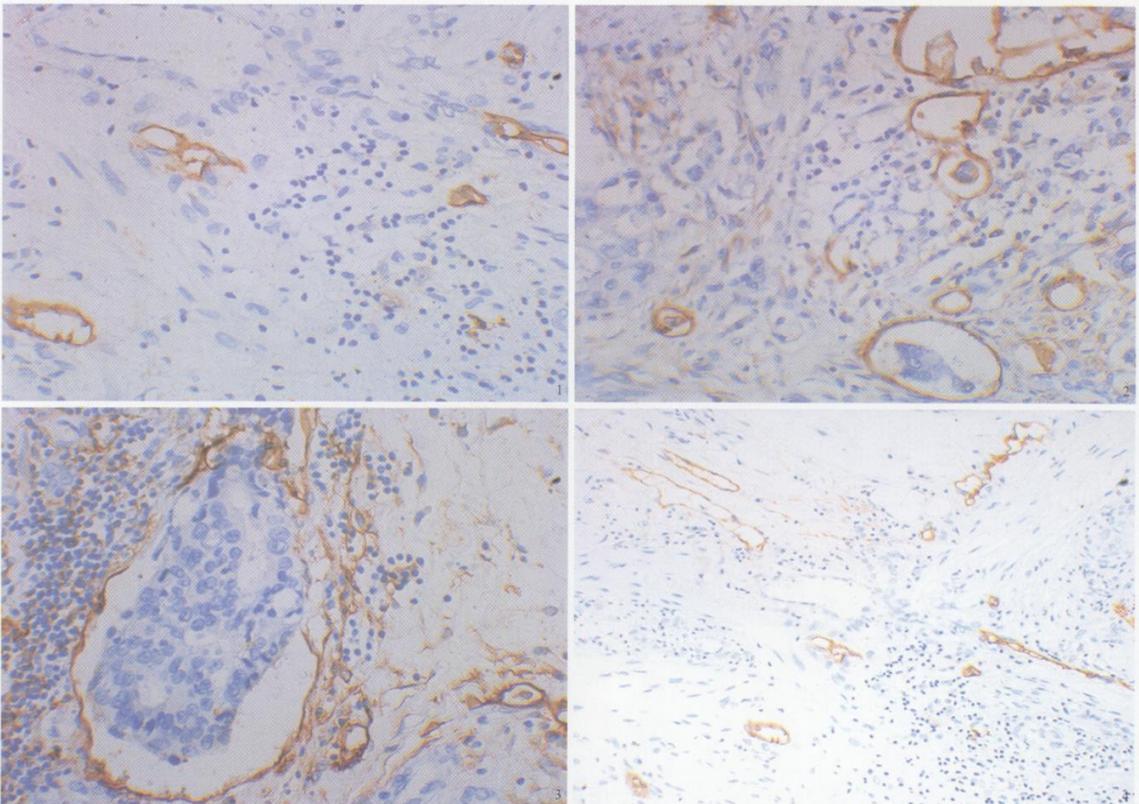


图1 正常直肠组织黏膜下见棕褐色淋巴管,但管腔小而数量较少($\times 200$)。图2 微淋巴管内未见RBC,少数微淋巴管内可见淋巴细胞($\times 200$)。图3 无淋巴结转移的直肠癌组织中可见微淋巴管内癌栓形成($\times 400$)。图4 直肠癌组织中,肿瘤边缘区见管壁呈棕褐色的淋巴管,管腔较大,数量较多,而肿瘤中心区为无管腔或条索状($\times 200$)

Fig.1 Lymphatic microvessels stained with brown or yellow in normal submucosal rectal tissue were thin-walled and very few. Fig.2 No erythrocyte in lymphatic vessels lumen, but few containing lymphocytes. Fig.3 Positive immunostaining of lymphatic vessels in rectal cancer tissue outlining tumor embolus without lymph node metastasis. Fig.4 Lymphatic microvessels of rectal carcinoma showed more, large-walled structure in the peritumoral tissues, but no lumen or funicular structure in the intratumoral tissues