论著

文章编号:1000-5404(2007)09-0834-03

大鼠蛛网膜下腔出血后血脑屏障通透性变化

谢宗义,马 颖,程 远 (重庆医科大学附属第二医院神经外科,重庆 400010)

提 要:目的 探讨大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性变化。**方法** 雌性SD大鼠80只,分为生理盐水对照组(NS组)和SAH组。采用经额叶底面蛛网膜下腔插管至Willis环注血法建立SAH模型,在SAH后6、12、24、36、48、60、72 h等不同时间点,应用荧光分光光度计和荧光显微镜方法分别检测大脑皮质BBB对伊文思蓝(Evans Blue, EB)的通透性,同时利用透射电镜观察BBB超微结构变化。**结果** 与NS组比较,大脑皮质EB含量和漏出量的最大值均出现在SAH后36 h时($P<0.05$),于60 h时恢复至正常水平($P>0.05$)。BBB超微结构改变在SAH后36 h时最明显。**结论** BBB通透性改变发生在SAH急性期,是由多种因素共同所致,而且SAH后BBB具有自我修复特性。

关键词: 血脑屏障;蛛网膜下腔出血;大鼠;伊文思蓝

中图法分类号: R741.02; R743.35 **文献标识码:** A

Changes of blood brain barrier permeability after experimental subarachnoid hemorrhage

XIE Zong-yi, MA Ying, CHENG Yuan (Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To explore the dynamic changes of blood brain barrier (BBB) permeability after experimental subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats. **Methods** Eighty female SD rats were divided into normal saline control group ($n=10$) and SAH group ($n=70$). The SAH model was induced by injecting 300 μl of autologous arterial blood into the subarachnoid space near the circle of Willis *via* a cannula in an artificial hole between the olfactory bulb and frontal lobe. BBB permeability in cerebral cortex of SAH and normal saline rats was assessed at 6, 12, 24, 36, 48, 60, and 72 h after SAH establishment by fluorescence spectrophotometer and fluorescence microscopy for Evans Blue (EB) extravasation. The ultrastructural changes in BBB were observed with transmission electron microscope. **Results** Compared with the control group, the changes of Evans Blue content and extravasation in cerebral cortex of SAH group peaked at 36 h ($P<0.05$), and down to the normal level at 60 h after SAH ($P>0.05$). The severe ultrastructural abnormality was found at 36 h after SAH. **Conclusion** The changes of BBB permeability develop at the acute stage of SAH, resulting from multiple factors together. The BBB after SAH possesses a self-repairable property.

Key words: blood brain barrier; subarachnoid hemorrhage; rats; Evans Blue

动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aneurysmal subarachnoid hemorrhage, aSAH)常引起许多致命性的并发症,如脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)、颅内压(intracranial pressure, ICP)增高、脑水肿、迟发性缺血性神经功能障碍(delayed ischemic neurological deficits, DIND)。近年来,尽管在显微神经外科和神经血管内介入方面取得了较大的进步,但是自发性SAH的致残率和病死率并未得到有效控制[1]。既往研究主要集中于SAH后CVS方面,而针对SAH与血脑屏障(blood brain barrier, BBB)功能变化之间相互关系的研究较少。有研究表明,SAH后BBB通透性增加,而且,BBB功能障碍与DIND的发生和临床不良预后等密切相关。本研究分别采用定量和定性方法检测SAH后不同时间点皮质BBB通透性变化。

1 材料与方法

1.1 动物分组及材料

健康雌性SD大鼠80只,体质量200~250 g(本校实验动物中心提供)。分为生理盐水对照组(NS组)(10只)和SAH

作者简介:谢宗义(1973-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事蛛网膜下腔出血后血脑屏障损伤机制方面的研究。电话:(023)66567892,E-mail: xieshen20041021@163.com

通讯作者:程 远,电话:(023)63693542,E-mail: chengyuan023@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-09-11;修回日期:2006-11-20

组(70 只)，其中 SAH 组根据标本处理时间又分为 6、12、24、36、48、60、72 h 7 个亚组，每亚组各 10 只大鼠。伊文思蓝(EB)，美国 Sigma 公司；荧光分光光度计(日本 Shimadzu 公司)；倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)；透射电镜(日本 Olympus 公司)。

1.2　SAH 模型的制作

采用经额底插管注血法[2]并进行改良。大鼠经 10% 水合氯醛(0.35 g/kg)腹腔注射麻醉后，经右侧股动脉插管监测动脉血压、血气分析。持续监测直肠温度，用 40 W 灯泡加热维持体温(37.0 ± 0.5) ℃。将动物固定于脑立体定位仪上，保持颅顶水平位置。沿颅顶正中矢状线切开皮肤，钝性分离肌肉及骨膜，于前囟前 5.0 mm、中线右侧 3.0 mm 处，用电动牙科钻钻孔，孔径 1.0 mm，骨孔恰好位于前颅窝底与额极交界处。手术显微镜下显露额极，用 4 号针头小心将脑膜挑破，见清亮脑脊液(cerebrospinal fluid，CSF)流出时，将 PE10 导管尖端从额极紧贴前颅窝底蛛网膜下腔向双耳连线中点送入，深度为 0.9 ~ 1.0 cm(经解剖测量此长度导管顶端恰好位于 Willis 环前部)。用骨蜡封骨孔以防止 CSF 漏出。连接注射器回抽，见清亮 CSF 流出，证实未造成脑组织损伤。从股动脉插管抽取非肝素化的自体动脉血 300 μl，经 PE10 导管在30 s内缓慢注入蛛网膜下腔。拔出导管，医用生物胶封闭骨孔，缝合头皮，并维持头低位 30 min。NS 组按上述方法向蛛网膜下腔注入等量生理盐水。

1.3　BBB 通透性的测定

1.3.1　荧光分光光度计法　　参照文献[3]方法定量测定注血后不同时间点皮质 EB 含量的变化，EB 含量可以精确地反映 BBB 通透性。各组大鼠(每组 8 只)于实验终点前 1 h 经股静脉注射 2% EB 生理盐水溶液(5 ml/kg)，1 h 后行心脏灌注。开颅取全脑，行大体观察；快速切取双侧大脑皮质，样品称质量并置入盛有 50% 三氯乙酸(TCA)溶液 1.5 ml 的匀浆器中。匀浆和离心(10 000 r/min，20 min)，取上清液 1.0 ml，加入 1.5 ml 混合液(50% TCA 和无水乙醇按 1∶3的比例配制而成)，充分混匀。应用荧光分光光度计(激发波长 620 nm、发射波长680 nm、带宽 10 nm)测定荧光值。校零标准品为 50% TCA 按 1∶33 的比例加入无水乙醇。使用校零标准品配制不同浓度(100 ~ 3 200 ng/ml)的 EB 溶液，测定其荧光值，以绘制 EB 与荧光值之间的标准曲线。依据所测得的荧光值求得脑组织中 EB 含量，可以计算 BBB 对 EB 的通透率，以每克湿重脑组织内所含 EB 量(μg)表示。

1.3.2　荧光显微镜法　　各组取 1 只大鼠，实验步骤同 1.3.1。快速分离大脑皮质，沿水平方向行冰冻切片，片厚 20 μm，避光晾干，50% PBS 缓冲甘油封片，即刻倒置荧光显微镜下用蓝色激发光观察 EB 在皮质中的漏出情况。

1.4　BBB 超微结构观察

在预定采样时间，大鼠麻醉后，开胸经左心室灌注 2.5% 戊二醛 300 ml，快速取额叶皮质多块，立即置入 4.0% 戊二醛固定液中预固定(4 ℃，8 h)，经 0.1 mol/L PBS 冲洗，置入 0.1% 四氧化锇液中固定(4 ℃，2 h)，梯度乙醇脱水，用环氧树脂 Epon812 浸透，包埋，半薄切片光镜定位后，制备超薄切片，再经枸橼酸铅醋酸铀染色后，透射电子显微镜下观察。

1.5　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，运用 SAS 8.1 统计软件进行完全随机设计方差分析，多重比较用 Tukey-Kramer 方法。

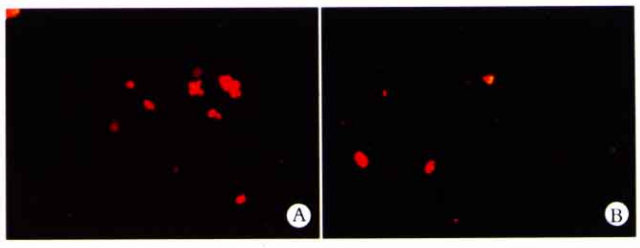
2　结果

2.1　SAH 模型的制作情况

SAH 组 4 只大鼠在注血过程中因突然呼吸停止无法恢复而死亡；9 只大鼠分别于术后不同时间点因颅内压增高而死亡，死亡率为 16.25%。增补动物 13 只至相应组。NS 组无大鼠死亡。根据监测结果显示，在手术过程中大鼠各项生理学参数变化均维持在正常范围内，表明大鼠生命体征平稳，能耐受此手术。在注血后 6 ~ 48 h 之间，SAH 组大鼠标本可见血凝块主要聚积在前颅窝底、基底池、Willis 环、大脑前、中动脉与基底动脉周围，大脑半球也可见散在血液分布；在注血后 60 h 时血凝块已极少。解剖过程中未发现 1 例有硬脑膜外血肿或皮质损伤。NS 组未见出血现象。证明大鼠 SAH 模型的制作是成功的。

2.2　BBB 通透性的变化

NS 组每克脑组织 EB 含量(8.593 ± 0.423) μg。与 NS 组比较，SAH 后 24、36、48 h 各亚组脑组织 EB 含量[分别为(21.333 ± 1.224)、(36.245 ± 1.370)、(19.078 ± 1.146) μg]明显增加，差异具有统计学意义($P < 0.05$)；与 NS 组比较，SAH 后 6、12、60、72 h 各亚组脑组织 EB 含量[分别为(9.803 ± 0.437)、(10.438 ± 0.418)、(9.934 ± 0.378)、(8.947 ± 0.703) μg]虽有不同程度的增加，但差异无统计学意义($P > 0.05$)。EB 在荧光显微镜蓝色激发光照射下，呈红色荧光斑。依据红色光斑的多少和大小，可以反映 EB 在脑组织中的漏出情况。荧光显微镜下显示 SAH 后 36 h 红色光斑最多，表明在 36 h 时皮质 EB 漏出量最大，与定量分析结果具有相同的变化趋势(图 1)。

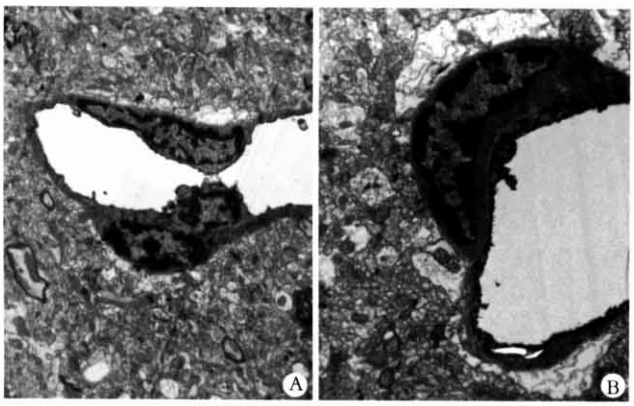


A：SAH 后 36 h；B：SAH 后 48 h

图 1　SAH 后大脑皮质中 EB 光斑观察　(荧光显微镜 ×200)

2.3　BBB 超微结构变化

NS 组大鼠额叶皮质 BBB 超微结构未见异常。SAH 组额叶皮质 BBB 超微结构在不同时期变化较明显。SAH 后 24 h，毛细血管周围间隙局部有散在片状水肿区，但毛细血管内皮细胞和基膜基本正常(图 2A)。SAH 后 36 h，毛细血管周围间隙明显扩大，管腔受压；星形胶质细胞足突水肿明显，其细胞膜尚保存，线粒体未见肿胀；内皮细胞管腔面不光滑，表面微绒毛增多，但紧密连接未见开放；基膜正常(图 2B)。SAH 后 60 h 上述变化逐渐开始恢复。



A:SAH 后 24 h (TEM ×7 000) ;B:SAH 后 36 h(TEM ×12 000)

图2 SAH 后额叶皮质 BBB 超微结构观察

3 讨论

3.1 SAH 动物模型

为探讨 SAH 后一系列病理生理学变化,许多研究者曾设计了多种 SAH 动物模型,如枕大池注血法、颈内动脉穿刺法,但各自都存在某些不足。在临床上,颅内动脉瘤是自发性 SAH 的主要原因,且大约 90% SAH 发生于前循环动脉瘤。为此,本研究采用经额底蛛网膜下腔插管至 Willis 环注血法建立 SAH 模型。该模型除具有上述模型优点之外,其更为最重要的是,血液主要分布在基底池系统,这与临床 SAH 血液分布相似。同时,避免了复杂的外科操作和出血程度变异大的缺点,重复性好,死亡率低;此外,整个操作时间不超过 40 min。因此,经额底插管至 Willis 环注血模型更加真实地模拟了前循环动脉瘤性 SAH 的病理生理学状态,更适合于 SAH 后病理生理学机制的研究。

3.2 SAH 后 BBB 通透性的变化及其机制

临床研究表明,大约有 40% SAH 患者在发病后 5 d 内出现 BBB 功能障碍。研究结果显示,BBB 通透性变化出现在 SAH 后 24 ~ 60 h,最高峰在 36 h 时;而在 SAH 后 60 h 时 BBB 通透性恢复正常;电镜观察也证实 BBB 超微结构变化在 SAH 后 36 h 时最明显;这些结果与此时血凝块极少相符合。Germano 等[4]研究报道,BBB 通透性在 SAH 后 36 h 开始增加,于 48 h 达最高峰,至 72 h 恢复正常。尽管研究结果并不完全一致,但 BBB 通透性改变具有相同的变化趋势,即 BBB 通透性改变发生在 SAH 急性期,而且,BBB 具有自我修复特性,能完全恢复至正常水平。我们推测,产生这些差异的原因可能与实验所采用的动物种类、SAH 模型的制作方法(包括注血量的多少)、检测 BBB 通透性的示踪剂和方法等诸多因素有关。

SAH 后急性期 BBB 损伤的机制非常复杂且尚不清楚。早期研究认为,BBB 损伤是由血液分解产物——血管活性物质和多种相关病理生理学变化(ICP 升高、脑血流量(cerebral blood flow, CBF)降低、脑血管自动调节功能失效)共同所致。然而,后来研究显示, ICP 的变化在 SAH 后 2 d 最明显,而且 ICP 升高所引起脑灌注压(cerebral perfusion pressure, CPP)的改变是非常短暂而有限的,说明 ICP 升高在 BBB 损伤过程中不可能起重要作用[5]。近年来研究也表明,SAH 后 BBB 功能障碍是独立于高血压、脑水肿、ICP、CBF 和 CPP 变化以及脑代谢紊乱之外的,尽管这些因素反过来会加重 BBB 损伤[4]。这些研究结果证实,来自血液分解产物的血管活性物质在 BBB 损伤机制中发挥着最主要作用。这些物质直接作用于脑微血管和(或)启动自由基反应、脂质过氧化反应[6]、炎症反应[7]以及凋亡级联反应[8],使脑微血管通透性增加,从而引起 BBB 损伤。由此推测,SAH 后 BBB 损伤是由多种因素共同所致。SAH 后血管活性物质、自由基、TXA_2、细胞因子等多种有毒物质可通过受损的 BBB 进入脑实质,从而引起脑水肿、脑缺血和损伤、甚至死亡。研究还表明,SAH 后 BBB 损伤与早期脑损伤、DIND 的发生和临床不良预后等密切相关[9]。这也诠释 BBB 损伤在 SAH 后缺血性脑损伤的发生中起着重要作用。因此,积极探索减轻 BBB 损伤的治疗方案,将有利于预防和治疗 SAH 后脑水肿和 DIND 的发生,从而改善 SAH 患者的临床预后。

本研究通过探讨 BBB 通透性变化规律,可以了解 BBB 开放时间和持续时间,为今后研究 BBB 损伤机制提供有价值的信息,也为何时采取干预措施提供科学的理论依据和合理的“时间窗”。

参考文献:

[1] Manno E M. Subarachnoid hemorrhage[J]. Neurol Clin, 2004, 22(2): 347 - 366.

[2] Lacy P S. A non-traumatic approach to ventral subarachnoid space near circle of willis[J]. J Neurosci Methods, 1988, 25(3): 239 - 242.

[3] Uyama O, Okamura N, Yanase M, *et al*. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1988, 8(2): 282 - 284.

[4] Germano A, d'Avella D, Imperatore C, *et al*. Time-course of blood brain barrier permeability changes after experimental subarachnoid haemorrhage[J]. Acta Neurochir (Wien), 2000, 142(5): 575 - 581.

[5] Jacowski A, Crockard A, Burnstock G, *et al*. The time course of intracranial pathophysiological changes following experimental subarachnoid haemorrhage in the rat[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1990, 10(6): 835 - 849.

[6] Sehba F A, Mostafa G, Knopman J, *et al*. Acute alterations in microvascular basal lamina after subarachnoid hemorrhage[J]. J Neurosurg, 2004, 101(4): 633 - 640.

[7] Sercombe R, Dinh Y R, Gomis P. Cerebrovascular inflammation following subarachnoid hemorrhage[J]. Jpn J Pharmacol, 2002, 88(3): 227 - 249.

[8] Park S, Yamaguchi M, Zhou C, *et al*. Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2004, 35(10): 2412 - 2417.

[9] Ostrowski R P, Colohan A R, Zhang J H. Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Neurol Res, 2006, 28(4): 399 - 414.

(编辑 王小寒)