文章编号:1000-5404(2011)16-1705-05

论著

大鼠蛛网膜下腔出血后皮质中 VDAC1 的表达与神经元凋亡的关系

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

[摘要] **目的** 观察大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后大脑皮质中 VDAC1 表达和皮质神经元凋亡,以及两者之间的关系,探讨电压依赖性阴离子通道蛋白 1 (voltage-dependent anion channel1, VDAC1)参与 SAH 后早期脑损伤的发生机制。**方法** 将 SD 大鼠 108 只按随机数字表法分为假手术组(n=18 只)和 SAH 组(n=90,下设 SAH 后 6、12、36、48、72 h 5 个时相点,每个时相点 18 只)。采用视交叉前池注血法建立 SAH 模型,应用 RT-PCR、免疫组化和 Western blot 分别检测大鼠 SAH 后不同时相点 VDAC1 在 mRNA 水平、蛋白质水平的表达变化。凋亡原位末端标记法(Tunel)观察 SAH 后不同时相点大脑皮质神经元凋亡。**结果** 大脑皮质中 VDAC1 表达,无论在 mRNA 水平,还是在蛋白质水平,在 SAH 后 12 h 均明显增加[mRNA(2.40±0.19),蛋白(1.14±0.08)],于 36 h 时表达达最高峰[mRNA(3.40±0.65),蛋白(1.72±0.22)],于 48 h 开始下降[mRNA(1.94±0.30),蛋白(0.97±0.07)],至 72 h 时基本恢复正常(P>0.05)。TUNEL 法检测显示大鼠 SAH 后 12 h,大脑皮质中神经元凋亡细胞数开始增加,36 h 达到高峰,之后逐渐降低(P<0.05),72 h 时降至正常(P>0.05)。**结论** SAH 后不同时间点 VDAC1 表达水平的动态变化与神经元凋亡发生、发展的时相性是一致的,提示 VDAC1 可能通过细胞凋亡途径参与 SAH 后早期脑损伤的病理过程。

[关键词] 蛛网膜下腔出血;早期脑损伤;细胞凋亡;VDAC1
[中图法分类号] R743.35;R741.02 [文献标志码] A

Correlation between VDAC1 expression and neuronal apoptosis in cerebral cortex of rats in early brain injury after subarachnoid hemorrhage

Lei Bo, Xie Zongyi, Ma Ying, Cheng Yuan (Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the correlation between voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) expression and neuronal apoptosis in the cerebral cortex of rats after subarachnoid hemorrhage (SAH), and to investigate the mechanism of VDAC1 involved in the early brain injury after SAH. **Methods** A total of 108 SD rats were randomly divided into a sham operation group (n=18) and an SAH group (n=90). The SAH group was subdivided into 6-, 12-, 36-, 48-, and 72-h subgroups (n=18 for each subgroup; 6, 12, 36, 48, and 72 hours after SAH, respectively). An SAH model was induced by injecting blood (300 μl) into the pre-chiasmatic cistern. VDAC1 expression in the cerebral cortex at both mRNA and protein levels were examined by RT-PCR as well as immunohistochemistry and Western blotting at 6, 12, 36, 48 and 72 h after SAH. Neuronal apoptosis in the cerebral cortex was evaluated by TUNEL at 6, 12, 36, 48 and 72 h after SAH. **Results** VDAC1 expression increased significantly at 12 h after SAH [mRNA (2.40±0.19), protein (1.14±0.08)], peaked at 36 h [mRNA (3.40±0.65), protein (1.72±0.22)], decreased at 48 h [mRNA (1.94±0.30), protein (0.97±0.07)], and fell to a normal level at 72 h (P>0.05). The number of apoptotic neurons in the cerebral cortex, as measured by TUNEL, increased at 12 h after SAH, reached the peak level at 36 h, then began to decrease (P<0.05), and fell to a normal level at 72 h (P>0.05). **Conclusion** There is a positive correlation between VDAC1 expression level and neuron apoptosis degree in the cerebral cortex of rats at different time points after SAH, implying that VDAC1 may be involved in the pathologic process of early brain injury

[基金项目] 重庆市自然科学基金(2008BB5234)
[通信作者] 谢宗义,E-mail:zongyixie@yahoo.com.cn
马 颖,E-mail:maying1964@sohu.com

after SAH through apoptotic pathways.

[**Key words**] subarachnoid hemorrhage; early brain injury; apoptosis; VDAC1

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5234). Corresponding author: Xie Zongyi, E-mail: zongyixie@yahoo.com.cn, Ma Ying, E-mail: maying1964@sohu.com

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是最危险的脑血管疾病之一。近年来,尽管在诊断、显微外科手术和神经血管内介入治疗方面取得了长足的进步,但是其病死率和致残率并未得到有效控制,病死率仍然较高,幸存者中约30%的患者因继发性脑损伤,遗留不同程度的后遗症,给社会和家庭造成严重的经济负担[1]。令人遗憾的是,迄今为止,仍未探索到能有效减轻SAH后脑损伤的治疗方法。近年来,SAH后早期脑损伤被认为是SAH患者高死亡率的重要原因[2]。

电压依赖性阴离子通道蛋白1(voltage-dependent anion channel1, VDAC1)是存在于线粒体外膜上的膜蛋白,相对分子质量为31×10^3,能在膜上形成亲水性电压门控通道。研究表明,VDAC1作为线粒体通透性转运孔的主要组成成分,是启动线粒体介导细胞凋亡的重要因素[3]。目前有关VDAC1蛋白变化与心脏、神经系统等疾病关系的研究很多,但国内外尚少见其与SAH后早期脑损伤关系的研究。本研究通过建立大鼠SAH动物实验模型,探讨SAH后皮质VDAC1蛋白表达和神经元凋亡之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与材料

健康成年雄性SD大鼠108只,体质量250~280 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。采用随机数字表法将大鼠分为假手术组(sham组,$n=18$,其中每组6只用于凋亡检测和免疫组化,6只用于检测VDAC1 mRNA表达,6只用于检测VDAC1蛋白表达)和SAH组($n=90$),其中SAH组根据处理时间下设6、12、36、48、72 h 5个时相点,每个时相点18只(其中每组6只用于凋亡检测和免疫组化,6只用于检测VDAC1 mRNA表达,6只用于检测VDAC1蛋白表达)。兔抗鼠VDAC1多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗试剂盒、小鼠抗兔β-actin单克隆抗体购自英国Abcam公司,TUNEL检测试剂盒购自美国Roche公司,ECL化学发光试剂盒购自美国Amersham公司,总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR试剂盒购自TaKaRa大连宝生生物公司,蛋白抽提试剂盒、蛋白定量试剂盒、配胶试剂盒购自美国Bio-Rad公司,PVDF膜购自美国Millipore公司,预染蛋白质Marker(宽范围)购自美国Nacalai公司。

1.2 SAH模型的制作

采用改良的视交叉前池注血法建立大鼠SAH模型[4]。以35 g/L的水合氯醛按1 ml/100 g腹腔麻醉大鼠后,经右侧股动脉插管监测大鼠动脉血压;持续监测直肠温度,以电热毯加热,维持大鼠体温在(37.0±0.5)℃。沿颅顶正中矢状线切开皮肤在距前囟正中线前7.5 mm处用电动牙科钻钻孔,孔径为1.0 mm,挑破硬脑膜。在矢状面将PE10导管向前倾斜30°插入,直至尖端达前颅窝底,深度距大脑表面约1.0 cm,以骨腊封闭骨孔以防止脑脊液漏出。连接注射器回抽,见清亮脑脊液,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,经导管在30 s内匀速注入蛛网膜下腔。拔出导管,骨蜡封闭骨孔,缝合头皮,并维持头低位30 min。Sham组动物按上述方法操作,但用等体积的生理盐水代替血液注入蛛网膜下腔。

1.3 实验方法

1.3.1 RT-PCR检测各组VDAC1 mRNA表达 各组大鼠分别在预定时间点给予10%水合氯醛腹腔麻醉,断头并开颅取脑,冰上快速分离额顶叶皮质,并置于液氮保存备用。取各组额顶叶皮质50 mg,用Trizol核酸提取试剂盒抽提总RNA,紫外分光光度计测定RNA纯度,并计算其含量。按照RT-PCR试剂盒的说明进行逆转录,取逆转录产物进行PCR扩增,VDAC1引物序列:上游5′-GGCTGTGATGTGGACTTTGAC-3′,下游5′-CGACCTGATACTTGGCTGCTAT-3′,扩增长度为307 bp。β-actin内参引物:上游5′-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3′,下游5′-CTGGAAGGTG GACAGCGAGG-3′,扩增长度为200 bp。扩增条件为:94 ℃预变性5 min;94 ℃变性30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,30个循环;最后72 ℃ 10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下观察并拍照,Quantity One软件分析。

1.3.2 Western blot检测VDAC1蛋白的表达 取各组额顶叶皮质100 mg置于匀浆器中,加入100 μl蛋白裂解液,冰上充分匀浆,静置30 min后,低温高速离心(4 ℃,12 000 r/min),收取上清液即为总蛋白,-80 ℃冰箱保存备用。BCA法检测蛋白质浓度。100 ℃变性10 min,等量上样60 μg蛋白,12% SDS-PAGE分离后转膜。5%脱脂奶粉常温封闭2 h,分别加入1∶1 000稀释的VDAC1抗体,4 ℃反应过夜,PBST洗涤3次,再加入二抗(浓度为1∶5 000),室温培育1 h,洗涤3次,ECL化学发光显色。兔抗大鼠的β-actin (1∶5 000)为内参。在Bio-Rad凝胶成像仪上进行灰度分析。

1.3.3 免疫组化法检查VDAC1蛋白表达 各组大鼠分别在预定时间点给予10%水合氯醛腹腔麻醉,迅速开胸暴露心脏,经左心室置管至升主动脉,以生理盐水快速冲洗,而后以4%多聚甲醛灌注400 ml。断头并开颅取脑,切取视交叉后1~5 mm处脑组织,放入4%多聚甲醛4 ℃冰箱固定24 h。标本制成蜡块后,切取视交叉后2~3 mm处的脑冠状切面,片厚5 μm。采用S-P法进行免疫组化染色,各步骤按说明书进行(VDAC1一抗浓度为1∶1 000)。阳性细胞为细胞质呈黄色或棕黄色。在高倍(×400)视野下进行图像采集,使用Image Pro Plus 6.0软件对图像进行分析,计算平均光密度值。

1.3.4 TUNEL法检测皮质神经元凋亡 各组大鼠按上述免

疫组化法取材并制成石蜡切片后，切片经常规脱蜡至水，具体操作程序按试剂盒说明书进行操作。光镜下凋亡细胞呈棕黄色，于高倍镜（×400）下观察 10 个视野（来自不同切片），将镜下结果直接输入计算机，由计算机软件自动按标准计数阳性细胞。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 8.1 统计软件，首先对计量资料进行正态性检验及方差齐性检验，组间资料比较应用单因素方差分析，随后再进行 Dunnett 检验，两两比较应用 LSD-t 检验。

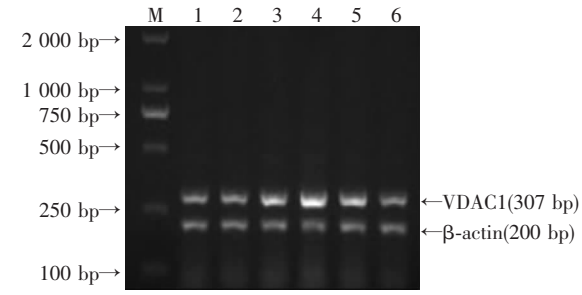
2 结果

2.1 SAH 后皮质 VDAC1 mRNA 表达的动态变化

与 sham 组（1.32 ± 0.12）比较，在 SAH 后 6 h 时 VDAC1 mRNA 表达（1.33 ± 0.11）差异无统计学意义（$P > 0.05$）。在 SAH 后 12 h 时 VDAC1 mRNA 表达开始上调（2.40 ± 0.19），有统计学差异（$P < 0.05$）；36 h 时达到高峰［（3.40 ± 0.65），$P < 0.05$，$P < 0.01$］；以后逐渐下调（$P < 0.05$），但 48 h 仍维持在较高水平［（1.94 ± 0.30），$P < 0.05$］。在 SAH 后 72 h 时 VDAC1 mRNA 表达水平（1.42 ± 0.23）仍高于 sham 组，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见图 1。

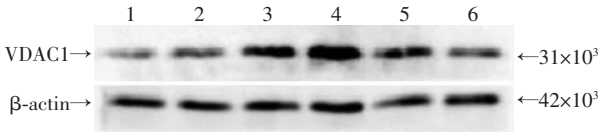
2.2 SAH 后皮质 VDAC1 蛋白表达的动态变化

与 sham 组（0.54 ± 0.05）比较，在 SAH 后 6 h 时 VDAC1 蛋白表达（0.65 ± 0.04）差异无统计学意义（$P > 0.05$）。在 SAH 后 12 h 时 VDAC1 蛋白表达开始上调［（1.14 ± 0.08），$P < 0.05$］；36 h 时 VDAC1 蛋白表达达到高峰［（1.72 ± 0.22），$P < 0.05$，$P < 0.01$］；以后逐渐下调，但 48 h 仍维持在较高水平［（0.97 ± 0.07），$P < 0.05$］。在 SAH 后 72 h 时 VDAC1 蛋白表达（0.71 ± 0.06）仍高于 sham 组水平，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见图 2。



M：DNA 标准（DL 2000）；1：sham 组；2：SAH 后 6 h 组；3：SAH 后 12 h 组；4：SAH 后 36 h 组；5：SAH 后 48 h 组；6：SAH 后 72 h 组

图 1 RT-PCR 检测皮质 VDAC1 在 mRNA 水平的表达

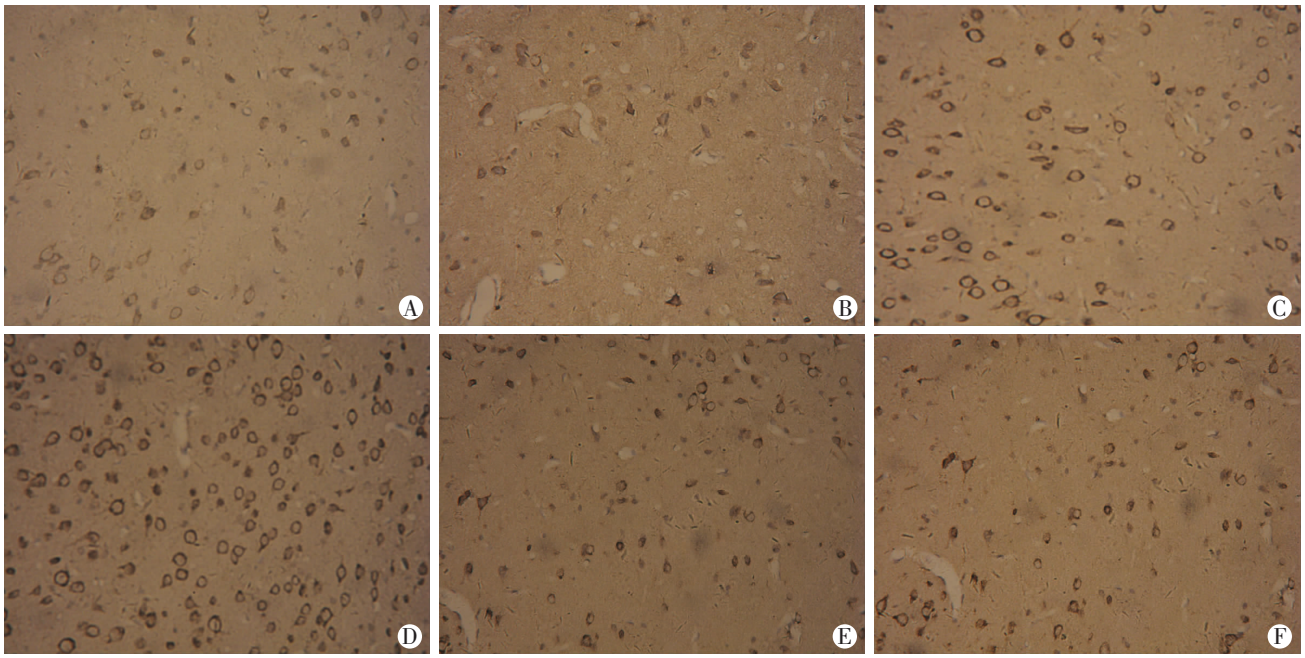


1：sham 组；2：SAH 后 6 h 组；3：SAH 后 12 h 组；4：SAH 后 36 h 组；5：SAH 后 48 h 组；6：SAH 后 72 h 组

图 2 Western blot 检测 VDAC1 蛋白的表达

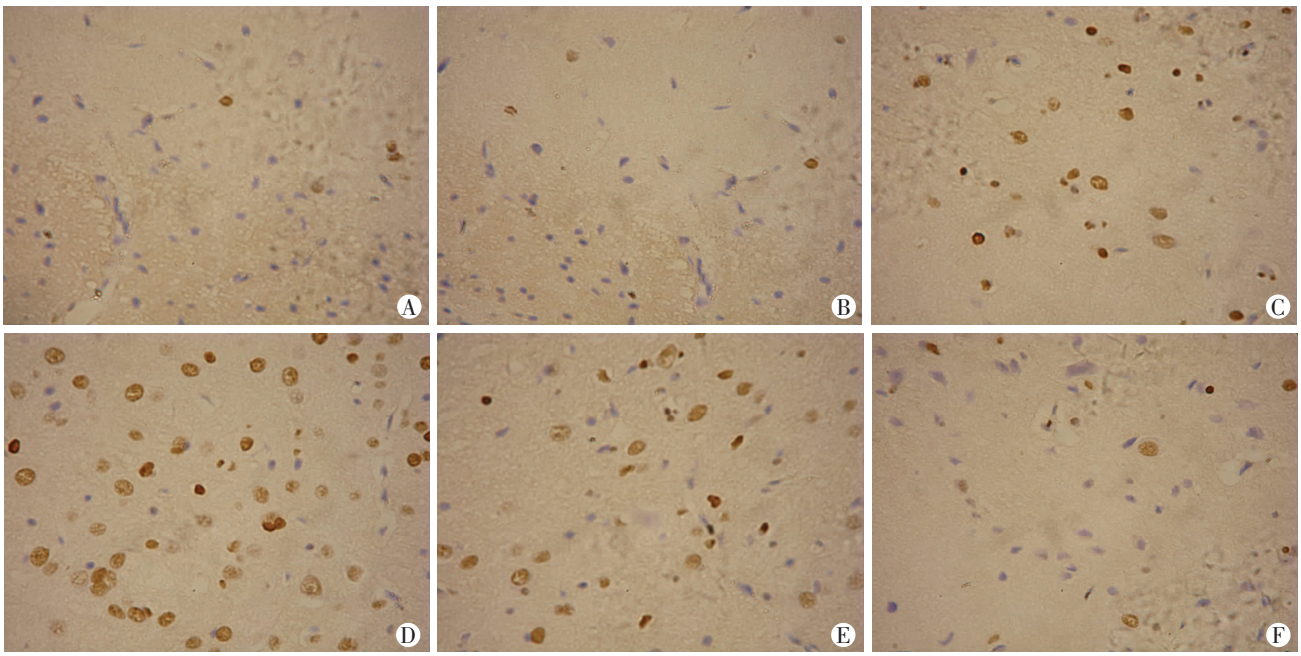
2.3 免疫组化法检测皮质 VDAC1 蛋白表达

VDAC1 表达位于细胞细胞质，免疫组化染色可见其细胞质被染成黄色或棕黄色。Sham 组、SAH 后 6、12、36、48、72 h 组光密度值分别为（309.1 ± 16.3）、（296.9 ± 12.8）、（430.1 ± 21.2）、（685.8 ± 30.9）、（405.2 ± 19.7）、（329.9 ± 18.5）。与 sham 组相比，SAH 后 6 h 时皮质 VDAC1 蛋白表达无明显差异（$P > 0.05$）。SAH 后 12 h 皮质 VDAC1 蛋白表达开始增加（$P < 0.01$），36 h 时 VDAC1 蛋白表达达到高峰（$P < 0.01$）；以后逐渐下调，但 48 h 仍维持在较高水平（$P < 0.05$）。在 SAH 后 72 h 时 VDAC1 蛋白表达水平仍高于 sham 组，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见图 3。



A：sham 组；B：SAH 后 6 h 组；C：SAH 后 12 h 组；D：SAH 后 36 h 组；E：SAH 后 48 h 组；F：SAH 后 72 h 组

图 3 免疫组化法检测各组大脑皮质 VDAC1 的表达（S-P ×400）



A:sham 组;B:SAH 后 6 h 组;C:SAH 后 12 h 组;D:SAH 后 36 h 组;E:SAH 后 48 h 组;F:SAH 后 72 h 组

图 4 TUNEL 法检测各组大脑皮质神经元凋亡 (×400)

2.4 TUNE 法检测皮质神经元细胞凋亡

TUNEL 标记法检测阳性细胞的信号强弱不等,高倍镜下显示出浅染(Ⅰ型细胞)和深染(Ⅱ型细胞)的 2 种细胞,Ⅱ型细胞可见阳性信号位于核内,有的不仅位于核内且弥散于细胞质及突起,在高倍镜下可见在核周靠近细胞膜处有数个散在的圆形颗粒状结构,这可能是即将形成凋亡小体的神经细胞。Sham 组、SAH 后 6、12、36、48、72 h 时阳性细胞计数分别为(15±2)、(16±2)、(26±3)、(35±4)、(22±2)、(14±1)。SAH 后 6 h 时可见 TUNEL 阳性神经元,但与 sham 组相比无明显差异($P>0.05$)。SAH 后 12 h 皮质 TUNEL 阳性细胞数开始增加,与 sham 组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),36 h 皮质 TUNEL 阳性细胞数目和密度最高($P<0.05$,$P<0.01$);以后逐渐下降,但 48 h 皮质 TUNEL 阳性细胞数仍较多,与 sham 组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。SAH 后 72 h 时皮质 TUNEL 阳性细胞数与 sham 组无统计学差异($P>0.05$)。见图 4。

3 讨论

最新研究表明,早期脑损伤(early brain injury,EBI)可能是 SAH 患者的重要死亡原因,是指发生于 SAH 起病后 72 h 内整个脑组织发生的损伤,通常发生在脑血管痉挛之前[5]。它通过各种途径,包括缺血途径、凋亡途径、炎症途径等,导致神经元凋亡、血脑屏障破坏、脑水肿。这表明早期脑损伤是 SAH 未来研究的重点。然而,目前国内外关于 EBI 的深入研究较少,尤其是 EBI 的发生机制尚未阐明。

本实验采用视交叉前池注血法建立 SAH 模型,该模型不同于以往国内常用的枕大池二次注血模型,将自体血一次性注入视交叉前池,既避免了反复操作的复杂程序及动物死亡率的增加,又能较为准确的模拟前循环动脉瘤破裂出血血液分布特点,因此更适合于对早期脑组织、血管病理生理改变的研究[6]。凋亡是细胞死亡的重要形式,在中枢神经系统疾病中得到广泛研究。众多研究证实[7-9],SAH 诱导脑组织中神经细胞、神经胶质细胞以及血管内皮细胞发生凋亡。TUNEL 染色发现 SAH 后 12 h 皮质神经元凋亡阳性细胞数开始增加,36 h 凋亡阳性细胞数最多,之后开始下降,于 72 h 凋亡阳性细胞数基本恢复至 sham 组水平,提示神经元凋亡是 EBI 病理过程中常见的病理变化之一[10]。Cahill 等[11]研究发现应用凋亡抑制剂,通过抑制凋亡相关蛋白的表达,使脑内神经元的凋亡显著减少,同时实验动物死亡率下降、脑水肿程度减轻,改善动物神经功能,表明凋亡在 SAH 后 EBI 中起重要作用,抑制凋亡能够减轻 SAH 后神经功能损害。此外,凋亡尚与 SAH 后脑血管痉挛有关,抑制凋亡可以缓解脑血管痉挛[12]。目前研究表明,SAH 后细胞凋亡的发生可能通过死亡受体途径、依赖或非依赖半胱天冬酶(caspase)途径、线粒体途径等 3 种不同的凋亡途径[5]。通过对细胞凋亡的研究发现,线粒体在调节细胞凋亡中发挥着关键作用,尤其是被称为细胞凋亡主

开关的线粒体通透性转运孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP),是细胞色素C、Sma C、AIF等凋亡诱导因子的主要来源。MPTP位于线粒体内外膜间,是一种由蛋白质组成的复合体,主要由外膜的电压依赖的阴离子通道(VDAC)、内膜的腺苷酸转化酶(ANT)及基质的亲环蛋白D(CyP-D)组成。其中VDAC调节通道的开放和闭合,地位尤其重要[13]。

VDAC位于线粒体外膜,有3种同分异构体,在人类主要是VDAC1和VDAC2,目前已知功能最多、研究最为广泛的是VDAC1。VDAC1具有单通道传导性、选择性、电压依赖性等特性,而且这些性质在真核生物中是高度保守的。VDAC1作为MPTP的主要成分,通过与bcl-2家族蛋白相互作用调控MPTP的开闭,调节线粒体内的凋亡蛋白通过线粒体外膜释放到细胞质,从而介导细胞凋亡。其具体作用机制如下:抗凋亡蛋白Bcl-xL能与VDAC1直接结合,导致VDAC1关闭,抑制Cyt-C的释放;促凋亡蛋白Bax、Bak与VDAC1直接结合后,加强VDAC1的活性,使MPTP开放,促进Cyt-C释放。总之,VDAC1是促凋亡和抗凋亡蛋白的瞄定点,是细胞色素C释放通道外膜的组成成分[14]。本实验RT-PCR检测显示,SAH后12 h VDAC1在mRNA水平表达开始增加,36 h达到高峰,并于48 h开始下降,72 h基本降至sham组水平,说明其转录水平及表达活性具有规律性,且与神经元凋亡水平呈正相关;实验中通过免疫组化和Western blot分别检测VDAC1在蛋白质水平的表达变化,其结果同样表明VDAC1蛋白表达变化与皮质神经元凋亡在时相上具有一致性;同时,VDAC1的免疫组化表明,阳性细胞主要定位于皮质神经元,提示VDAC1通过线粒体途径参与皮质神经元凋亡过程。目前研究已证实,SAH后早期脑损伤的发生与神经元凋亡有关[15]。本实验研究还发现,VDAC1的表达变化主要集中在SAH后前3 d,推测VDAC1表达上调可能与早期脑损伤的发生、发展有关。

因此,我们认为SAH后VDAC1可能通过线粒体途径引起皮质神经元发生凋亡,参与SAH后EBI的病理过程,为今后更深入研究EBI奠定了实验基础,同时也为临床治疗SAH后EBI提供理论依据。但是,SAH后EBI的具体机制尚不完全清楚,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Van-Gijn J, Kerr R S, Rinkel G J. Subarachnoid haemorrhage [J]. Lancet, 2007, 369(9558): 306-318.

[2] Schievink W I. Intracranial aneurysms [J]. N Engl J Med, 1997, 336(1): 28-40.

[3] Newmeyer D D, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death [J]. Cell, 2003, 112(4): 481-490.

[4] 谢宗义, 马颖, 程远. 大鼠蛛网膜下腔出血后血脑屏障通透性变化[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(9): 834-836.

[5] 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.

[6] Prunell G F, Mathiesen T, Diemer N H, *et al*. Experimental subarachnoid hemorrhage: subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models [J]. Neurosurgery, 2003, 52(1): 165-175.

[7] Sabri M, Kawashima A, Ai J, *et al*. Neuronal and astrocytic apoptosis after subarachnoid hemorrhage: a possible cause for poor prognosis [J]. Brain Res, 2008, 1238: 163-171.

[8] 郭宗铎, 孙晓川, 何朝晖, 等. 蛛网膜下腔出血后早期海马MMP-9的表达与海马神经元凋亡的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 71-74.

[9] Yatsushige H, Ostrowski R P, Tsubokawa T, *et al*. Role of c-Jun N-terminal kinase in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurosci Res, 2007, 85(7): 1436-1448.

[10] Cahill J, Calvert J W, Zhang J H. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(11): 1341-1353.

[11] Cahill J, Calvert J W, Marcantonio S, *et al*. p53 may play an orchestrating role in apoptotic cell death after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. Neurosurgery, 2007, 60(3): 531-545.

[12] Cahill J, Calvert J W, Solaroglu I, *et al*. Vasospasm and p53-induced apoptosis in an experimental model of subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2006, 37(7): 1868-1874.

[13] Sheridan C, Martin S J. Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis [J]. Mitochondrion, 2010, 10(6): 640-648.

[14] Rostovtseva T K, Tan W, Colombini M. On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction [J]. J Bioenerg Biomembr, 2005, 37(3): 129-142.

[15] Cahill J, Zhang J H. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction? [J]. Stroke, 2009, 40(3 Suppl): S86-S87.

(**收稿**:2011-02-14;**修回**:2011-03-15)

(编辑 王小宴)