基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1498-04

缺血联合组织型纤溶酶原激活剂对大鼠脑动脉调节功能的影响

张合亮[1],马廉亭[1],徐国政[1],杨 铭[1],姚国杰[1],席永强[2],刘 征[1]
(1.广州军区武汉总医院神经外科,武汉 430070;2.垣曲县人民医院神经外科,垣曲 043700)

【摘 要】目的:研究缺血和组织型纤溶酶原激活剂对脑动脉调节功能的影响,探讨急性缺血性中风溶栓治疗后再灌注损伤发生的可能机制。方法:动物随机分为假手术组(对照组,n=6)、组织型纤溶酶原激活剂灌注组(rtPA 组,n=6)、缺血组(ISC 组,n=8)和缺血并组织型纤溶酶原激活剂灌注组(rtPA- 缺血组,n=8)。雄性 Wistar 大鼠制作局灶性脑缺血模型,应用压力型小动脉测量仪对大鼠离体大脑中动脉的内径和外径进行测量,据此计算出动脉力学参数和肌源性张力,行组间对比。结果:在压力由 60 mmHg 升至 120 mmHg 时,对照组肌源性反应强烈,肌源性张力明显增加;而其它 3 组肌源性反应消失,肌源性张力下降。对照组动脉直径最小(P<0.05 vs 其它 3 组),rtPA- 缺血组最大(P<0.05 vs 其它 3 组)。相比对照组和 rtPA 组,缺血组和 rtPA- 缺血组应变增大(P<0.01 vs 其它 2 组),管壁硬度系数 β 值变小(P<0.01 vs 其它 2 组),应力 - 应变曲线右移。结论:缺血和 rtPA 均可消弱脑动脉的肌源性反应,2 者相加具有协同效应;同时缺血又可影响动脉的力学特性。这种变化可使受累动脉丧失其作为阻力血管对血流的限制作用,造成下游微循环过度灌注,易发生脑组织缺血再灌注损伤。

【关键词】脑缺血;组织型纤溶酶原激活剂;大脑中动脉;肌源性反应;力学特性;再灌注损伤
【中国图书分类法分类号】R363.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-01-21

Combined effects of ischemia and tissue plaminogen activitor on cerebrovascular autoregulation in rats

ZHANG He-liang, et al
(*Department of Neurosurgery, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Region*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the combined effect of cerebral ischemia and tissue plasminogen activator on cerebrovascular autoregulation and evaluate the probably mechanisms of ischaemia-reperfusion injury after thrombolysis. *Methods*: The middle cerebral artery occlusion model was used in male Wistar rats to induce 90 mins of focal cerebral ischemia. External and internal diameter of middle cerebral artery was measured in vitro using a pressure myograph system, and mechanical parameters and myogenic tone were calculated. Arteries were either nonischemic (control; n=6), nonischemic and perfused with rtPA for 50~60 mins (rtPA; n=6), ischemic (ISC; n=8), or ischemic and perfused with rtPA for 50~60 mins (rtPA-ISC; n=8). The data were then compared among the groups. *Results*: Control arteries increased myogenic tone from 60 mmHg to 120 mmHg and responded myogenic reactivity, all other groups decreased tone at 120 mmHg and lost myogenic reactivity; Diameters of control arteries showed the least (P<0.05 vs all three others), rtPA-ISC group showed the largest (P<0.05 vs all three others); Compared with control and rtPA arteries, ISC and rtPA-ISC arteries showed an increased strain (P<0.01 for all), a decreased β values (P<0.01 for all), and rightward shift of the stress-strain relationship. *Conclusion*: These results demonstrate that both ischemia and rtPA perfusion diminish myogenic reactivity of cerebral artery and that the combination may produce an additive effect; at same time, ischemia can alter mechanical properties of cerebral artery. These changes may contribute to cerebral ischemia-reperfusion injury during or after thrombolysis by altering upstream cerebrovascular resistance.

【Key words】Cerebral ischemia; Tissue plasminogen activator; Middle cerebral artery; Myogenic reactivity; Mechanical property; Reperfusion injury

作者介绍:张合亮(1974 -),男,主治医师,博士,
研究方向:脑血管病血管内介入治疗。
通讯作者:马廉亭,男,教授,E-mail:mlt1937@126.com。

急性缺血性中风后行重组组织型纤溶酶原激活剂(Recombinant tissue plasminogen activator, rtPA)溶栓治疗,可使缺血脑组织获得重新灌注,明显改善患者预后[1]。然而,rtPA 应用后却易出现恶性脑水肿和出血转化[2],造成缺血再灌注损

伤。因此,明确 rtPA 应用后缺血再灌注损伤的发病机制将有利于此项技术的临床应用。实验证实,急性缺血性中风后梗塞区周围动脉自主调节功能下降,而且这种功能下降程度与患者病情的恶化明显相关[3];而 rtPA 应用后可以产生自由基,并对血管壁造成损伤[4]。因此,我们考虑缺血和 rtPA 对脑动脉的共同损伤,可能造成其调节功能的下降,而受累动脉的这种功能下降可能与缺血再灌注损伤的发生有关。

动脉的力学特性对循环动力学、血管的发育和动脉性疾病的发展有直接的影响[5]。其常用评定参数包括管壁周向应力(σ)、周向应变(ε)及管壁硬度系数(β),其中 β 是衡量弹性体产生弹性变形难易程度的指标,其值越小,表示弹性体越易变形。脑动脉是肌性动脉,管壁平滑肌细胞达脑动脉组织成分的 73%[5]。正常情况下,脑动脉平滑肌细胞处于轻度的收缩状态,维持一定的肌源性张力,利于动脉直径快速、实时的改变,以适应脑组织对血流的需求;跨壁压的增减可诱发平滑肌细胞的主动舒缩,这种反应被称为肌源性反应,是脑血流调节的主要机制[5]。我们通过对动脉力学特性和肌源性反应的对比,了解缺血和 rtPA 对脑动脉功能的影响,以探讨急性缺血性中风行 rtPA 溶栓治疗后缺血再灌注损伤发生的可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物和分组

实验采用雄性 Wistar 大鼠,体重 250 ~ 300 g,共 28 只,由广州军区武汉总医院实验中心提供。随机数字法分为 4 组:假手术处理(对照组)6 只;假手术处理 +rtPA 灌注(rtPA 组)6 只;缺血 90 min(缺血组)8 只;缺血 90 min+rtPA 灌注(rtPA- 缺血组)8 只。

1.2 药品和溶液

rtPA 购自勃林格殷格翰公司,硝普钠购自武汉制药厂。生理盐溶液(PSS)由广州军区武汉总医院实验中心自行配制。PSS 的组成(mmol/L)为:NaCl 119.0,KCl 4.7,$MgSO_4$ 1.2,KH_2PO_4 1.2,$NaHCO_3$ 25.0,$CaCl_2$ 2.5,葡萄糖 5.5 和 EDTA 0.026,pH 7.4。并通以 21%O_2-5%CO_2-74%N_2 的混合气体。将 $CaCl_2$ 换成浓度为 1×10^{-5} mol/L 的硝普钠组成无钙 PSS(0PSS),将 PSS 中加入 400 μg/ml rtPA 组成 rtPA-PSS。

1.3 局灶性脑缺血模型制备

线栓法[6]栓塞大鼠右侧大脑中动脉。4%氟烷麻醉下,将 3-0 眼科单股尼龙丝线由颈外动脉残端向颅侧导入阻塞大脑中动脉起始端,尼龙丝线自颈总动脉分叉部插入约(18.5 ± 0.5) mm,同时阻断同侧颈总动脉。对照组和 rtPA 组常规麻醉和切口,血管不予处理。

1.4 大脑中动脉准备及压力型小动脉测量仪

90 min 后,氟烷重新麻醉,取出脑组织置入 4℃的 PSS 中,显微镜下游离术侧大脑中动脉,剪取 3 mm 无分支的一段血管移入灌流槽中,其中对照组和缺血组灌流槽内充满 PSS,rtPA 组和 rtPA- 缺血组灌流槽内充满 rtPA-PSS。将血管的一端套接在管口直径约 50 μm 的玻璃导管上,用 10-0 眼科尼龙线牢固固定,注射器缓慢冲走血管内残留血液;再将血管另一端套接在另一根玻璃导管上。将灌流槽移至压力型小动脉测量仪(Pressure myograph system,DMT,Denmark)的倒置显微镜台上,放大倍数为 10 倍目镜 × 10 倍物镜。用 Myoview 软件控制血管内压力并测量所需数据。初始平衡阶段保持液体流入端压力为 20 mmHg,流出端压力调至 0 mmHg,以冲走血管中残留物。初始平衡阶段持续 10 min 后,流入、流出端压力均改为 20 mmHg。在血管中无液体流动状态下进行以下步骤:将灌流系统压力升至 140 mmHg,并将纵向拉力传感器读数置零,以去除小血管的弯曲。降低压力至 70 mmHg 平衡 30 min,在 20~80 mmHg 之间反复升降压力 3 次,以除去血管的机械性滞后效应。自动脉被置入灌流槽内,到动脉准备工作完成,操作时间控制于 50~60 min,以保证 rtPA 组和 rtPA- 缺血组动脉 rtPA 灌流时间为 50~60 min。

1.5 动脉直径测量

灌流槽内充满 37℃ PSS, 管腔压力先调至 10 mmHg,后以 20 mmHg 为一个梯级, 使管腔压力由 20 mmHg 逐步升至 120 mmHg,每个梯级停留 3 min,进行动脉外径和内径的测量。测量完毕后,将灌流槽内液体换为 37℃0PSS,行外径和内径测量,其压力梯级与 PSS 下相同。

1.6 力学参数及肌源性张力计算

肌源性张力(%)=(IR0Ca- IRCa)/IR0Ca × 100[7], ε =(IR0Ca -IR0Ca10)/IR0Ca10, σ =P(IR0Ca^2+ER0Ca^2)/(IR0Ca^2-ER0Ca^2)[5]。其中,IR0Ca 为 0PSS 中所测动脉内径,IRCa 为 PSS 中动脉内径,IR0Ca10 表示 0PSS 中管腔压力为 10 mmHg 时的动脉内径,P 代表管腔压力(1 mmHg=1 333.22 dyn/cm^2),ER0Ca 表示 0PSS 中动脉外径。弹性模量由应力 - 应变数据对方程 σ = σ 10exp(β ε)拟合得出,σ 10 表示管腔压力为 10 mmHg 时的管壁周向应力[8]。

1.7 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS13.0 行数据处理。析因设计方法分析肌源性张力;其余指标,采用以管腔压力为重复测量因素的方差分析行差异性对比,Bonferroni 法组间多重对比,方差不齐时应用 Dunnett T3 法。取 $P<0.05$ 作为差异具有统计学意义的判断标准。

2 结 果

2.1 肌源性反应

在行 70 mmHg 平衡期间, 所有动脉均表现出一定的肌源性张力。在管腔压力由 60 mmHg 升至 120 mmHg 时,仅对照组动脉出现一定程度的收缩,动脉直径缩小,表明肌源性反应活跃;而其它 3 组动脉表现为直径随管腔压力升高单调性增大,表明肌源性反应受损(图 1)。动脉直径差异有统计学意义(F=16.650,P=0.000);对照组直径最小(P=0.014 vs rt-

PA 组;P=0.004 vs 缺血组;P=0.000 vs rtPA- 缺血组);rtPA- 缺血组直径最大(P=0.013 vs rtPA 组;P=0.015 vs 缺血组)(表2)。

2.2 肌源性张力

不同压力下(F=15.571,P=0.000)和不同组别间(F=175.993,P=0.000)肌源性张力差异均具有显著性意义,并且压力和组别之间交互效应显著(F=1 752.344,P=0.000)。固定压力情况下,处理组单独效应分析显示:60 mmHg 时,各组肌源性张力差异不具统计学意义(F=0.779,P=0.517);120 mmHg 时,组间差异具统计学意义(F=562.058,P=0.000),对照组显著高于其它各组(P 均 <0.01),尽管 rtPA- 缺血组与 rtPA 组肌源性张力差异不具统计学意义(P=0.947),但均小于缺血组(P 均 <0.01,表 2)。当管腔压力由 60 mmHg 升至 120 mmHg 时,仅对照组肌源性张力增加(P=0.000),而其它各组均出现不同程度的下降(P 均 <0.01,表 2)。

2.3 动脉力学特性

缺血可造成动脉管壁周向应变增加, 而 rtPA 对应变影响不明显;对照组与 rtPA 组(P=1.000),缺血组与 rtPA- 缺血组(P=1.000)应变差异不具统计学意义;而缺血组和 rtPA- 缺血组应变则均大于对照组和 rtPA 组(P 均 <0.01,表 2)。相对于对照组和 rtPA 组而言,缺血组和 rtPA- 缺血组应力 - 应变曲线右移(图 3)。缺血后动脉管壁硬度系数 β 值缩小,而 rtPA 对 β 值影响不明显;对照组与 rtPA 组(P=1.000),缺血组与 rtPA- 缺血组(P=1.000)β 值差异不具统计学意义;而缺血组和 rtPA- 缺血组 β 值均小于对照组和 rtPA 组(P 均 <0.01,表 2)。

3 讨 论

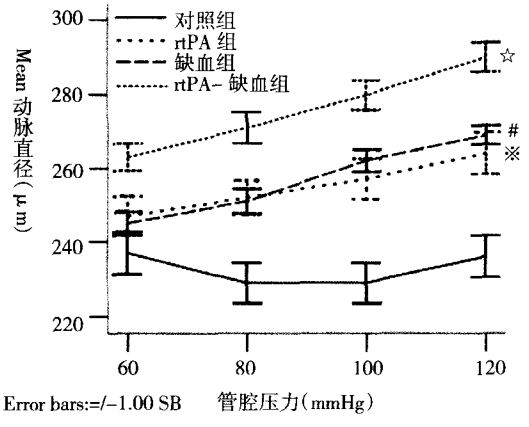
在灌注压出现波动时,大脑中动脉和其它脑动脉固有的肌源性反应和肌源性张力可使血管维持适当的阻力,以调控局部血流,保护下游微血管系统[9]。脑动脉的这种功能可在对照组压力 - 直径关系曲线上得到证实 (图 1)。在 60~120 mmHg 之间,随着管腔压力的升高,对照组动脉肌源性反应明显,直径缩小,以增加血管阻力,缓解因血压升高造成的过渡灌注。而其它 3 组动脉由于肌源性反应削弱,动脉随管腔压力增加被动扩张,丧失了作为阻力血管对下游组织的保护作用。表现在肌源性张力上,对照组随压力上升,肌源性张力增加;而其它 3 组则出现了不同程度的下降。

本研究结果显示:①缺血对动脉肌源性反应和力学特性均有显著影响,缺血后动脉肌源性反应受损,高压下肌源性

表 2 各组动脉直径、肌源性张力、管壁周向应变和硬度系数 β 值比较

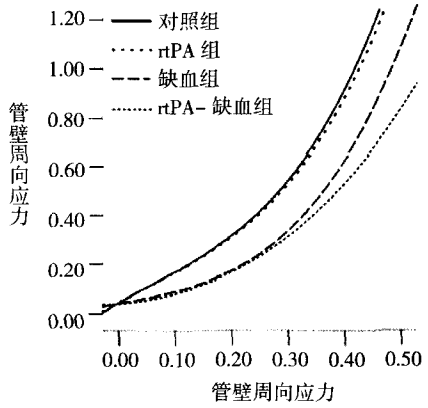
组别	动脉直径(μm)	肌源性张力		管壁周向应变	硬度系数 β
		60 mmHg	120 mmHg		
对照组	233 ± 3	24.5 ± 0.7	38.1 ± 0.7‡	0.26 ± 0.02	9.0 ± 0.4
rtPA 组	255 ± 3*	23.2 ± 0.7	16.6 ± 0.3#	0.25 ± 0.02	9.4 ± 0.4
缺血组	257 ± 2*	24.3 ± 0.7	18.7 ± 0.2*	0.32 ± 0.02§	7.0 ± 0.1§
rtPA- 缺血组	276 ± 3☆	23.8 ± 0.5	16.2 ± 0.5☆	0.32 ± 0.02‡	6.8 ± 0.1‡
F	16.650	0.779	11.954	14.613	38.127
P	0.000	0.517	0.000	0.000	0.000

☆#§‡P <0.005 vs 对照组;P <0.005 vs rtPA- 缺血组;#P <0.005 vs 缺血组;§‡P <0.005 vs rtPA 组. 肌源性张力:‡#*☆P <0.005 vs 60 mmHg 时



P=0.014,#P=0.004,☆P=0.000 vs 对照组;*P=0.013,#P=0.015 vs rtPA- 缺血组

图 1 60~120 mmHg 范围内对照组、rtPA 组、缺血组和 rtPA- 缺血组的动脉直径 - 管腔压力关系曲线



相对于对照组和 rtPA 组,缺血组和 rtPA- 缺血组曲线右移明显;rtPA 组相对于对照组,rtPA- 缺血组相对于缺血组曲线右移均不显著。表明缺血对应力 - 应变关系影响明显,而 rtPA 对应力 - 应变关系影响向则不明显

图 3 对照组、rtPA 组、缺血组和 rtPA- 缺血组动脉管壁周向应力 - 周向应变关系曲线

张力下降，动脉直径扩大；对力学特性的影响造成缺血后动脉硬度下降，易变形，同样压力下动脉应变增大。②rtPA 对动脉肌源性反应影响明显，对动脉力学特性影响不显著；rtPA 灌注可削弱动脉肌源性反应，降低高压下动脉肌源性张力。

实验证实，急性缺血性中风会造成缺血区及其周围脑动脉的扩张[10]，而这种扩张与脑水肿的恶化明显相关[11]。本研究显示：不仅 rtPA 和缺血对动脉肌源性反应和肌源性张力的损伤具有协同作用，而且缺血还可造成动脉力学特性的改变，使动脉变软，易扩张。根据 Poiseuille's 定律[$Q=(\pi r4\Delta P)/(8\eta L)$]，脑血流量(Q)与管腔半径(r)的 4 次幂正相关，所以，即使管腔大小发生轻微的改变，脑血流量也会出现较明显的变化。这样，急性缺血性中风行 rtPA 治疗后，大脑中动脉等脑阻力动脉将显著扩张，丧失其作为阻力血管对血流的限制作用，原有缺血区血流量剧增，出现过渡灌注。

急性缺血性中风后可因毛细血管内皮细胞肿胀、管腔内皮皱襞形成及血管周围水肿等原因造成微循环阻塞，在梗塞动脉再通后早期仍会出现微循环"无灌注"现象[12]。另外，缺血还可造成微循环和血脑屏障通透性的增加甚至断裂，而 rtPA 的应用可以明显加重这种损伤[2]。这样，在高灌注和回流受阻的双重作用下，将出现原有缺血区血液的大量淤滞。而微循环和血脑屏障通透性的增加和断裂则极易使淤滞的血液渗出，从而加重脑水肿甚至出现出血转化，形成缺血再灌注损伤。

总之，脑缺血本身及后续 rtPA 治疗均可对脑血管系统形成损伤，造成其功能下降，而这种功能下降可能与缺血再灌注损伤的发生有关。本研究结果显示，脑动脉功能下降主要表现在高压下，正常生理压力下则不明显，而高血压本身即为 rtPA 溶栓治疗后缺血再灌注损伤发生的危险因素。因此，急性缺血性中风行 rtPA 溶栓治疗后维持正常血压至关重要，而血管保护剂的应用也将对患者预后产生良好的影响[13]。

(注：第一作者张合亮为南方医科大学 2007 级博士研究生)

参 考 文 献

[1] Tanne D, Macho R F, Lin Y, et al. Hemostatic activation and outcome after recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2006, 37(7):1798-1804.

[2] Dijkhuizen R M, Asahi M, Wu O, et al. Rapid breakdown of microvascular barriers and subsequent hemorrhagic transformation after delayed *recombinant tissue plasminogen activator treatment in a rat embolic* stroke model[J]. Stroke, 2002, 33(8): 2100-2104.

[3] Dohmen C, Bosche B, Graf F, et al. Identification and clinical impact of impaired cerebrovascular autoregulation in patients with malignant middle cerebral artery infarction[J]. Stroke, 2007, 38(1): 56-61.

[4] Zhao B Q, Ikeda Y, Ihara H, et al. Essential role of endogenous tissue plasminogen activator through matrix metalloproteinase 9 induction and expression on heparin-produced cerebral hemorrhage after cerebral ischemia in mice[J]. Blood, 2004, 103(7): 2610-2616.

[5] Coulson R J, Cipolla M J, Vitullo L, et al. Mechanical properties of rat middle cerebral arteries with and without myogenic tone[J].J Biomech Eng, 2004, 126(1):76-81.

[6] Kozak W, Kozak A, Johnson M H, et al.Vascular protection with candesartan after experimental acute stroke in hypertensive rats: a dose-response study[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 326(3): 773-782.

[7] Jarajapu Y P, Grant M B, Knot H J.Myogenic tone and reactivity of the rat ophthalmic artery[J].Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(1): 253-259.

[8] Mulvany M J, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries[J]. Physiol Rev, 1990, 70(4): 921-961.

[9] Mellander S. Functional aspects of myogenic vascular control[J]. J Hypertens Suppl, 1989, 7(4): S21-31.

[10] Nqai A C, Nquven T S, Meno J R, et al. Postischemic augmentation of conducted dilation in cerebral arterioles[J].Stroke, 2007, 38(1): 124-130.

[11] Tsuchidate R, He Q P, Smith M L, et al. Regional cerebral blood flow during and after 2 hours of middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17(10): 1066-1073.

[12] del Zoppo G J, Schmid-Schonbein G W, Mori E, et al. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons[J].Stroke, 1991, 22(10): 1276-1283.

[13] Faqan S C, Hess D C, Machado L S, et al. Targets for vascular protection after acute ischemic stroke[J].Pharmacotherapy, 2005, 25(3): 387-395.

(责任编辑：关蕴良)