基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0678-03

法舒地尔对蛛网膜下腔出血大鼠血管保护作用的机制研究

张晓冬,张 明,吴海涛,孙晓川
(重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过建立大鼠实验性蛛网膜下腔出血模型,探讨法舒地尔对蛛网膜下腔出血后血管的保护作用及机制。方法:将48只大鼠随机分为假手术对照组(Control group,C组)、蛛血组(SAH group,S组)和法舒地尔治疗组(Treatment group,T组),通过枕大池单次注血法建立大鼠蛛网膜下腔出血模型,分别于1 d、3 d、7 d和14 d采用光镜观察基底动脉形态变化,测量基底动脉管径和管壁厚度。运用免疫组化SP法检测基底动脉上内皮型-氧化氮合成酶(Endothelial nitric oxide synthase,eNOS)的表达。结果:S组大鼠的基底动脉痉挛从建模后1 d开始出现,3 d后达到高峰,7 d后明显减轻;eNOS的表达在各时相点明显减弱。T组基底动脉的管径和管壁厚度在建模后3 d、7 d与S组有统计学差异($P<0.05$);同时eNOS的表达在3 d、7 d、14 d较S组增强($P<0.05$)。结论:法舒地尔可以有效缓解SAH后的脑血管痉挛,增加eNOS在动脉管壁上的表达可能是其重要的作用机制之一。

【关键词】蛛网膜下腔出血;法舒地尔;脑血管痉挛
【中国图书分类法分类号】R743.35 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-01-26

Vascular protective effect of fasudil after subarachnoid hemorrhage in rats

ZHANG Xiao-dong, et al
(*Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the vascular protective effects and mechanism of fasudil in rats after experimental subarachnoid hemorrhage. *Methods*: Forty-eight rats were divided into sham-operated control group, subarachnoid hemorrhage group and treatment group. Model induced by autologous blood injection into cisterna magna, and rats were killed on day 1, day 3, day 7 and day 14 after subarachnoid hemorrhage. Morphological change of basilar artery was observed by light microscopy, diameter and wall thickness of basilar artery were measured respectively. eNOS expression in basilar artery was detected by immunohistochemical SP method. *Results*: Vasospasm of basilar artery initiated on day 1, reached its peak on day 3, and mitigated on day 7 after SAH. eNOS expression decreased at each time point in SAH group. Compare with SAH group, diameter and wall thickness of basilar artery were significantly reduced on day 3 and day 7 in treatment group ($P<0.05$), and eNOS expression also statistically increased on day 3, day 7 and day 14 ($P<0.05$). *Conclusion*: Fasudil can effectively relieve post-SAH cerebral vasospasm. Upregulation of eNOS expression in the arterial wall might be one of important mechanisms.

【Key words】Subarachnoid hemorrhage; Fasudil; Cerebral vasospasm

脑血管痉挛(Cerebral vasospasm,CVS)是蛛网膜下腔出血(Subarochnoid hemorrhage,SAH)最严重的并发症,也是造成患者死亡和致残的重要原因。目前对SAH后CVS发生的机制尚不十分清楚,也缺乏满意的预防和治疗方法,CVS已经成为临床研究的热点。法舒地尔(fasudil,又名HA1077)是一种新型异喹啉磺胺衍生物,可以通过抑制Rho激酶发挥一系列药理作用,从而有效缓解脑血管痉挛,改善蛛网膜下腔出血患者的预后。研究发现内皮型一氧化氮合成酶(Endothelial nitric oxide synthase,eNOS)的表达降低可能在CVS的发生中发挥了重要作用,而eNOS的表达受到Rho激酶的调控,但具体机理不详[1-4]。本实验通过建立大鼠实验性SAH模型,应用免疫组化等方法,探讨SAH后法舒地尔的血管保护作用及其机制。

作者介绍:张晓冬(1972-),男,博士,
研究方向:脑血管疾病。
通讯作者:孙晓川,男,教授,E-mail:sunxch1445@gmail.com。

1 材料与方法

1.1 材料

48只健康SD大鼠,雌雄不拘,体重200~300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。盐酸法舒地尔注射液购自天津红日药业股份有限公司。兔抗eNOS抗体购自武汉博士德生物技术有限公司。SP试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限

公司。DAB 试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 SAH 模型的建立及分组 48 只 SD 大鼠，随机分为对照组（Control group，C 组）、蛛血组（SAH group，S 组）和法舒地尔治疗组（Treatment group，T 组），每组各 16 只大鼠。每组再按动物处死时间分为 4 个亚组，每亚组各 4 只大鼠。采用枕大池单次注入自体动脉血法建立大鼠 SAH 模型。S 组和 T 组动物用 3.5%水合氯醛溶液按 1ml/100 g 大鼠体重的剂量腹腔注射麻醉。待麻醉显效后，剪去枕项部及腹－股交界区被毛，将大鼠仰卧位固定，分离股动脉，用 1 ml 注射器穿刺抽取动脉血 0.5～0.6 ml，加入肝素钠溶液抗凝。缝合股部切口，翻转大鼠为俯卧位，颅顶正中切口，暴露寰枕筋膜后，穿刺枕大池，见清亮脑脊液流出，注入动脉血 0.3 ml，用明胶海绵敷贴局部，防止脑脊液漏。维持大鼠于尾高头低位 30 min，制备 SAH 模型。T 组大鼠在制成 SAH 模型后 1 h 按 3 mg/kg 的剂量腹腔注射法舒地尔，以后每 12 h 按同样剂量给药直至处死动物。C 组大鼠在麻醉后暴露寰枕筋膜，将生理盐水 0.3 ml 注入枕大池内。

1.2.2 灌注固定，取材，切片 在预定的时间点（建模后 1 d、3 d、7 d、14 d），用 3.5%水合氯醛溶液腹腔注射麻醉大鼠后，开胸暴露心脏，经左心室置管于升主动脉，剪破右心耳，快速灌注生理盐水 100 ml 冲洗血液，随后灌注 4%多聚甲醛/0.1 mol/L PBS 300 ml 固定大鼠。断头，开颅取脑，切取脑桥部分的脑组织块（包含基底动脉），浸泡于 4%多聚甲醛/0.1 mol/L PBS 中，在 4℃冰箱内固定 24 h。标本经脱水、透明、浸蜡、包埋制成石蜡块，将包埋好的石蜡块进行切片，片厚 5 μm，裱片、烘烤后制成切片。选取切片用于苏木精－伊红（Hematoxylin and eosin，HE）染色和免疫组化染色。

1.2.3 HE 染色切片观察基底动脉形态变化 参考 Oruckaptan HH[5]等的方法，在 100 倍镜下用接目测微尺测量基底动脉的最大内径与最小内径，按以下公式计算校正管径，以减小管腔形态变异带来的误差。在 400 倍镜下用接目测微尺测量基底动脉管壁厚度（内膜层＋中膜层厚度）。

$$校正管径(\mu m)=\sqrt{最大内径\times最小内径}$$

1.2.4 免疫组化染色切片分析 石蜡切片行免疫组化 SP 法染色，棕黄色细颗粒为阳性染色标志。用 CCD 摄像系统采集 eNOS 免疫组化染色切片图像，采用 Image-pro plus 5.0 软件分析图像，分析阳性染色面积、积分光密度（IOD），并按以下公式计算平均光密度。

平均光密度＝积分光密度/阳性染色面积

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析，结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多个样本均数的比较采用单因素方差分析和 q 检验，以 $P\leqslant 0.05$，为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基底动脉的光镜观察及测量结果

C 组大鼠的基底动脉内膜光滑完整，内弹力膜无皱褶，平滑肌细胞排列整齐，外膜层薄。各时相点间 C 组基底动脉的管径和管壁厚度的变化不明显，差异无统计学意义（$P>0.05$）。建模后 1 d，S 组和 T 组大鼠基底动脉管腔缩小，内弹力膜出现轻度波浪样改变，平滑肌层轻度增厚，外膜增生不明显。建模后 3 d，S 组大鼠的基底动脉痉挛最严重，可见管腔明显缩小，内皮细胞部分脱落，内弹力膜明显皱褶，平滑肌层增生明显，外膜层增生和部分脱落，其校正管径和管壁厚度与建模后 1 d 比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。T 组大鼠基底动脉的形态学变化与 S 组类似，但程度较轻。S 组和 T 组基底动脉的校正管径和管壁厚度与 C 组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。T 组基底动脉的校正管径和管壁厚度与 S 组比较差异也有统计学意义（$P<0.05$）（图 1）。建模后 7 d，S 组大鼠基底动脉痉挛减轻，仍可见轻度的管腔缩小、内弹力膜皱褶和平滑肌层增生，其校正管径和管壁厚度与建模后 3 d 比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。T 组大鼠基底动脉形态与 C 组类似。S 组基底动脉的校正管径和管壁厚度与 C 组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。T 组基底动脉的管壁厚度与 S 组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。建模后 14 d，S 组和 T 组大鼠基底动脉痉挛消失，形态与 C 组相似。各组基底动脉的校正管径和管壁厚度比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。

各组各时相点的基底动脉校正管径和管壁厚度分别见表 1 和表 2。

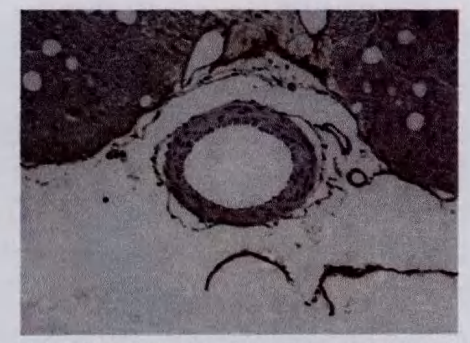
2.2 eNOS 在基底动脉上的表达

eNOS 在 C 组大鼠基底动脉的内膜、平滑肌层和外膜上均有表达，呈棕黄色细颗粒状。在建模后各时相点，eNOS 在 S 组大鼠基底动脉上的表达明显减弱，其平均光密度值与 C 组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。在建模后 3 d、7 d 和 14 d，eNOS 在 T 组大鼠基底动脉上的表达较 S 组增强，两者的平均光密度值比较差异有统计学意义（$P<0.05$）（图 2、3）。各组各时相点基底动脉上表达的 eNOS 的平均光密度值见表 3。



3 d S 组，基底动脉痉挛最严重，可见管腔明显缩小，内皮细胞部分脱落，内弹力膜明显皱褶，平滑肌层增生明显，外膜层增生和部分脱落（HE 染色 ×200）

图 1 S 组大鼠基底动脉 HE 染色



3 d S 组，基底动脉血管壁 eNOS 表达(呈棕黄色细颗粒)较对照组明显减弱(SP 染色 × 200)

图 2 蛛血组大鼠基底动脉 SP 染色



3 d T 组，基底动脉痉挛较 S 组减轻，管腔明显扩张，血管壁 eNOS 表达较蛛血组增强(SP 染色 × 200)

图 3 法舒地尔组大鼠基底动脉 SP 染色

表 1 基底动脉的校正管径 ($\bar{x} \pm s$)(μm)

时相点	n	C 组	S 组	T 组
1 d	4	234.62 ± 33.77	152.43 ± 30.88 *◇	140.90 ± 41.99 *
3 d	4	223.90 ± 42.69	98.59 ± 22.52*	154.67 ± 35.17*△
7 d	4	259.36 ± 44.12	180.79 ± 39.00*◇	210.02 ± 25.66◇
14 d	4	255.41 ± 30.87	268.67 ± 45.70◇	260.29 ± 35.62◇

注：*P<0.05，与 C 组比较；△P<0.05，与 S 组比较；◇P<0.05，与建模后 3 d 比较

表 2 基底动脉的管壁厚度 ($\bar{x} \pm s$)(μm)

时相点	n	C 组	S 组	T 组
1 d	4	12.50 ± 2.04	15.00 ± 3.54◇	16.25 ± 4.33
3 d	4	11.88 ± 1.25	25.00 ± 4.56*	18.13 ± 3.75*△
7 d	4	12.50 ± 2.04	18.13 ± 1.25*◇	14.38 ± 2.39△
14 d	4	11.25 ± 1.44	13.75 ± 1.44◇	11.88 ± 2.39

注：*P<0.05，与 C 组比较；△P<0.05，与 S 组比较；◇P<0.05 与建模后 3 d 比较

表 3 基底动脉上表达的 eNOS 的平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

时相点	n	C 组	S 组	T 组
1 d	4	0.355 ± 0.065	0.170 ± 0.045*	0.219 ± 0.020*
3 d	4	0.355 ± 0.090	0.207 ± 0.047*	0.354 ± 0.077△
7 d	4	0.332 ± 0.071	0.187 ± 0.029*	0.270 ± 0.043△
14 d	4	0.325 ± 0.041	0.223 ± 0.030*	0.296 ± 0.030△

注：*P<0.05，与 C 组比较；△P<0.05，与 S 组比较

3 讨 论

CVS 是指 SAH 后脑底大动脉延迟出现的狭窄，常伴有受累血管远端分布区灌注减少[6]，是 SAH 致死和致残的重要原因。有报道，eNOS 的表达降低能导致 SAH 后内皮细胞破坏以及 CVS 的发生[7]，同时离体实验中将重组腺病毒携带的 eNOS 基因导入血管，发现缓激肽和 P 物质诱导的血管扩张反应增强，表明 eNOS 的降低与 CVS 的发生关系密切[8]。而 eNOS 的表达受到 Rho 激酶的调控，由于 Rho 激酶参与了多种细胞功能，如平滑肌收缩、应力纤维的形成、细胞骨架的重构、细胞分化与迁移、细胞凋亡等[1]。做为 Rho 激酶抑制剂的代表药物，法舒地尔可解除 Rho 激酶对肌球蛋白轻链磷酸酶的抑制作用(钙敏化效应)，进而减轻 SAH 后脑血管痉挛[2,3]。有实验表明，法舒地尔可通过增加 eNOS 的 mRNA 和蛋白质的表达，提高 eNOS 的活性及 NO 的产量；将法舒地尔应用于小鼠的脑梗塞模型，可以增加脑组织的血流量，缩小梗塞面积，改善神经功能评分；但是在 eNOS 基因缺陷型小鼠中，法舒地尔并没有显示出以上的神经保护功能，说明法舒地尔的神经保护作用机理是增加 eNOS 的表达，促进内皮来源的 NO 生成[9]。目前，法舒地尔对蛛网膜下腔出血后动脉血管壁 eNOS 表达的影响仍未见相关报道。

本研究发现，蛛血组大鼠基底动脉痉挛于建模后 3 d 达到高峰，7 d 后逐渐缓解，14 d 基本消失，与基础文献报道及临床典型表现一致[6,7]。基底动脉血管壁 eNOS 在建模后 1 d、3 d、7 d 的表达较对照组均明显减弱，与血管痉挛的发生发展同步，提示 eNOS 的降低可能参与了 SAH 后 CVS 发生的起始和发展阶段。但实验中 eNOS 的低表达一直持续到脑血管痉挛缓解后(14 d)，并未随着脑血管痉挛的缓解而升高，提示 eNOS 并不是导致血管痉挛的唯一原因，可能同时存在其它对抗血管痉挛的机制在 CVS 缓解期发挥作用。

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0681-04

慢性间歇性缺氧对大鼠血糖及其胰岛 B 细胞超微结构的影响

桂明才,李 兵,邱昌明,张 涛,赵 维
(重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:制作可应用于常压慢性间歇性缺氧(Chronic intermittent hypoxia,CIH)研究的动物模型,探讨 CIH 对大鼠血糖的影响及其胰岛 B 细胞超微结构变化的研究。方法:大鼠分别给予空气[对照组(Unhandled,control),UC 组]、间断低氧 4 周(CIH 组)及复氧 4 周[复氧组(Restore hypoxia),RH 组]处理后测定各组大鼠血糖,胰岛素,C 肽,计算胰岛素抵抗指数,同时用电镜观察胰腺 B 细胞超微结构变化。结果:与 UC 组、RH 组比较,CIH 组的血糖升高,存在胰岛素抵抗,胰腺 B 细胞超微结构发生轻微缺氧损伤改变,UC 组和 RH 组无明显改变。结论:CIH 致使大鼠胰岛 B 细胞损伤及功能紊乱,大鼠调节血糖功能降低,同时 CIH 组存在胰岛素抵抗,使血糖升高,RH 能使其恢复正常。

【关键词】慢性间歇性缺氧;血糖;胰岛素;大鼠
【中国图书分类法分类号】R766.49 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-02

The effect of chronic intermittent hypoxia on blood glucose and pancreatic islets B-cell ultrastructure in rats

GUI Ming-cai, et al
(*Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To set up the rat model of chronic intermittent hypoxia under normal pressure and study its effect on the level of blood glucose and pancreatic islet B-cells, ultrstructure. *Methods*: Rats were respectively exposed to room air 4 weeks (unhandled control, UC), intermittent hypoxia 4 weeks (chronic intermittent hypoxia, CIH), intermittent hypoxia 4 weeks and then

作者介绍:桂明才(1977-),男,硕士,
研究方向:耳鼻咽喉头颈外科。
通讯作者:李 兵,男,副教授,E-mail:dclibing@sina.com.cn。
基金项目:重庆市卫生局科研项目(编号:2008-2-38)。

本实验还发现,法舒地尔治疗组大鼠基底动脉痉挛在 3 d、7 d 时较蛛血组明显减轻(管腔扩张、平滑肌增厚缓解),提示在血管痉挛高峰期,法舒地尔具有明确的治疗作用。在建模后 3 d、7 d 和 14 d,eNOS 在法舒地尔治疗组大鼠的基底动脉上表达较蛛血组显著增强,提示增加 eNOS 在血管壁上的表达可能是法舒地尔减轻脑血管痉挛的重要机制之一,而且该机制在血管痉挛缓解期仍然发挥作用。

综上所述,eNOS 表达降低可能在 SAH 后 CVS 的起始和发展中发挥了重要作用。法舒地尔可以有效缓解 SAH 后的脑血管痉挛,除了抑制钙敏化效应外,增加 eNOS 在动脉管壁上的表达可能是其重要的作用机制之一。

参 考 文 献

[1] Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(9): 1767-1775.

[2] Suzuki Y, Shibuya M, Satoh S, et al. Safety and efficacy of fasudil monotherapy and fasudil-ozagrel combination therapy in patients with subarachnoid hemorrhage: sub-analysis of the post-marketing surveillance study[J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2008, 48(6): 241-248.

[3] Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiolog[J]. J Mol Med, 2002, 80(10): 629-638.

[4] Murthy K S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut[J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 345-374.

[5] Oruckaptan H H, Caner H H, Kilinc K, et al. No apparent role for neutrophils and neutrophil-derived myeloperoxidase in experimental subarachnoid haemorrhage and vasospasm: a preliminary study[J]. Acta Neurochir (Wien), 2000, 142(1): 83-90.

[6] Dankbaar J W, Rijsdijk M, van der Schaaf I C, et al. Relationship between vasospasm, cerebral perfusion, and delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Neuroradiology, 2009, 51(12): 813-819.

[7] Hino A, Tokuyama Y, Weir B, et al. Changes in endothelial nitric oxide synthase mRNA during vasospasm after subarachnoid hemorrhage in monkeys[J]. Neurosurgery, 1996, 39(3): 562-568.

[8] Onoue H, Tsutsui M, Smith L, et al. Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in canine basilar artery after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 1998, 29(9): 1959-1966.

[9] Rikitake Y, Kim H H, Huang Z, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection[J]. Stroke, 2005, 36(10): 2251-2257.

(责任编辑:冉明会)