维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0082-04

一种新的前循环蛛网膜下腔出血动物模型

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)

【摘 要】目的:建立一种简便、重复性好的蛛网膜下腔出血(SAH)动物模型。方法:在立体定位下将导管插入视交叉前池,注入 300μl 自体动脉血建立 SAH 模型。监测动脉血压、血气分析、颅内压,采用激光多普勒血流量仪(LDF)测定局部脑血流量(rCBF)和进行神经行为学评分。结果:血液广泛分布在前颅窝底、Willis 环、基底池周围。SAH 组大鼠的血压、血 pH、PaO_2、$PaCO_2$ 值之间差异无统计学意义($P>0.05$)。ICP 在 SAH 后 1min 迅速增高至最大值($P<0.05$)。rCBF 在 SAH 后 1min 迅速降低,于 SAH 后 3min 进一步降低至最低点($P<0.05$)。大部分大鼠在 SAH 后 24h 有轻度的神经行为异常,在 SAH 后 48h 恢复正常。结论:该模型能更好地模拟临床 SAH,重复性好,更适合于前循环动脉瘤性 SAH 后病理生理学机制的研究。

【关键词】蛛网膜下腔出血;颅内压;脑血流量;动物模型

【中图图书分类法分类号】R743.35;R-332 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-06-28

A new animal model of subarachnoid hemorrhage in the anterior circulation

XIE Zong-yi, et al

(*Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a simple and reproducible animal model of subarachnoid hemorrhage (SAH). *Methods*: The SAH model was induced by stereotaxic insertion of a cannula through an artifical hole into the prechiasmatic cistern and injection of 300μl autologous arterial blood. The arterial blood pressure, blood gases analysis, and intracranial pressure were monitored, and regional cerebral blood flow (rCBF) was assessed by laser Doppler flowmetry (LDF). A neurobehavioral evaluation was performed at 24 and 48h after SAH. *Results*: The subarachnoid blood was widely distributed throughout the anterior cranial fossa base, Willis circle and basal cisternal system. There was no statistically significant difference between BP, pH, PaO_2 or $PaCO_2$ values of the SAH group and those of the control group ($P>0.05$). ICP increased rapidly to the maximum 1min after SAH ($P<0.05$). rCBF decreased rapidly in 1min after SAH, and continued to fall to its nadir in 3min later ($P<0.05$). Slight neurobehavioral disorders were showed for most rats subjected SAH in 24h, but normalized in 48h after SAH. *Conclusion*: This new model resembles clinical SAH. It is very reproducible and appropriate for the study on the pathophysiological mechanisms of aneurysmal SAH in the anterior circulation.

【Key words】Subarachnoid hemorrhage; Intracranial pressure; Cerebral blood flow; Animal models

近年来,尽管在动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aneurysmal subarachnoid hemorrhage, aSAH)的诊断和治疗方面取得了明显的进步,但是自发性 SAH 的致残率和病死率并未得到有效控制,致残率仍高达 50%,病死率为 25%[1],其原因在于 SAH 的病理生理学机制未完全阐明。由于在患者进行临床研究受到多种因素的限制,因此转向于动物 SAH 实验性研究。多年来,许多研究者一直在寻找和建立一种趋于完美的 SAH 动物模型,但现有的各种方法都存在着某些不足。本研究介绍一种新的 SAH 动物模型的建立。

作者介绍:谢宗义(1973-),男,主治医师,博士,主要研究方向:蛛网膜下腔出血。

通讯作者:程 远,男,教授,联系电话:023-63693542。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康雌性 SD 大鼠 25 只,体重 250~300g(由重庆医科大学实验动物中心提供),随机分为 SAH 组(15 只)和生理盐水对照组(NS 组)(10 只)。

1.2 SAH 模型的制作

维普资讯 http://www.cqvip.com

大鼠经 10%水合氯醛(0.35g/kg 体重)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。肛表持续监测直肠温度，手术期间通过 40W 的灯泡加热维持体温在(37.0±0.5)℃之间。将动物固定于脑立体定位仪上，保持颅顶水平位置。颅顶部手术区常规消毒，沿颅顶正中矢状线切开皮肤，钝性分离肌肉及骨膜，在距前囟正中线前 7.5mm 处，用电动牙科钻钻孔，孔径为 1.0mm，骨孔恰好位于两嗅束之间。手术显微镜下用 4 号针头小心将脑膜挑破，见清亮脑脊液(Cerebrospinal fluid，CSF)流出时，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 1.0cm (经解剖测量此长度导管顶端恰好位于视交叉前 2.0~3.0mm)。用骨蜡封住骨孔以防止 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 300μl，经 PE10 导管在 30s 内缓慢注入蛛网膜下腔。拔出导管，医用生物胶封闭骨孔，缝合皮肤，并维持头低位 30min。NS 组按上述方法向蛛网膜下腔注入等量生理盐水。于术后 48h 采用过度麻醉断头处死，迅速开颅取脑，行大体标本观察。

1.3 生理学参数的监测

持续监测动脉血压至术后 60min；在术前、注血结束时、术后 30、60min 分别测定动脉血气分析。

1.4 颅内压的监测

将导管(管径为 1.0mm)经环枕筋膜植入枕大池，并用医用生物胶封闭穿刺点，连接至压力传感器，持续监测颅内压(Intracranial pressure，ICP)至术后 60min。

1.5 脑血流量的测定

采用激光多普勒血流量仪(LDF) 测定局部脑血流量(Regional cerebral blood flow，rCBF)。于冠状缝前 3.0mm、正中线旁 2.0mm 处用牙科钻作一 2.0mm 骨孔，将 LDF 探头置于此骨孔硬脑膜表面(远离大血管)，于术前、术后不同时间点测定前额皮质 rCBF 的变化。将 SAH 前的 LDF 值作为基础值，SAH 后的 LDF 值以基础值的百分数表示。

1.6 神经行为学评估

参照 Kaoutzanis 等[9]的神经行为学评分法(表 1)。评分范围为 3~11 分，3 分为最差，11 分为完全正常，分别于术前、术后 24h、48h 对大鼠进行评分。

1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SAS8.1 统计软件进行完全随机设计方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 大鼠神经行为学评分表

神经行为学	评分
运动反应	
自由行走	5
行走困难	4
不能行走	3
刺痛时肢体收缩	2
刺痛时无反应	1
睁眼反应	
自行睁眼	4
声音刺激睁眼	3
刺痛睁眼	2
不能睁眼	1
进食	
自由进食	2
拒绝进食	1
总分	11

2 结 果

2.1 SAH 模型的制作情况

2.1.1 死亡率 SAH 组部分大鼠，在注血过程中出现短暂呼吸、心跳骤停、四肢抽搐，约 15~30s 后缓解；1 只大鼠在注血过程中因突然呼吸停止无法恢复而死亡；3 只大鼠分别于术后 2、5、10min 因 ICP 升高而死亡，死亡率为 26.7%。

2.1.2 大体观察 SAH 组大鼠标本可见血液广泛分布在前颅窝底、Willis 环、基底池、大脑前、中动脉周围，大脑半球也可见散在血液分布(图 1)。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。

2.2 SAH 对大鼠生理学参数的影响



图 1 SAH 后 48h 大鼠脑大体标本观察

BP 在注血结束时略有上升，术后 30min 便恢复正常。血气分析结果示在术后 60min 恢复至正常范围内。SAH 组与 NS 组大鼠的 BP、血 pH 值、PaO_2、$PaCO_2$ 之间差异无统计学意义($P>0.05$)(表 2)。

2.3 ICP 的变化

SAH 组，在注血结束后 1min，ICP 迅速升高至最

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 SAH 期间大鼠生理学各项参数的变化

	术前	注血结束时	术后 30min	术后 60min
BP (mmHg)	114.0 ± 6.2	120.6 ± 5.4	117.3 ± 4.0	115.8 ± 5.1
pH(mmHg)	7.42 ± 0.04	7.41 ± 0.10	7.41 ± 0.03	7.39 ± 0.05
PaO_2 (mmHg)	124.3 ± 1.2	122.4 ± 3.0	118.9 ± 4.6	121.8 ± 3.6
$PaCO_2$ (mmHg)	38.5 ± 0.7	39.1 ± 0.5	37.8 ± 1.0	38.1 ± 1.2

大值(92 ± 13)mmHg;术后 2.5min,ICP 降至(80 ± 11)mmHg;在术后 1h,ICP 仍高于正常水平。NS 组,在术后 1min,ICP 也迅速升高至最大值(29 ± 4)mmHg;但在术后 15min 后,ICP 便基本恢复至正常水平。与 NS 组比较,SAH 后 1h 内 ICP 变化有显著性意义($P<0.05$)(图 2)。

2.4 SAH 对 rCBF 的影响

SAH 组,在注血结束后 1min,LDF 值迅速降低;术后 3min,LDF 值进一步降低至最低点;之后,LDF 值逐渐增加,但在术后 8h,LDF 值仍未恢复至正常水平。NS 组,在注入 NS 结束后 1min,LDF 值也迅速降低;但在术后 5min 后,LDF 值便基本恢复至正常水平。与 NS 组比较,SAH 后 8h 内 rCBF 变化在统计学均有显著性意义($P<0.05$)(图 3)。

2.5 SAH 对大鼠神经行为学的影响

在 SAH 后 24h,大部分大鼠出现轻度神经行为异常,表现为反应淡漠、运动减少、拒食($P<0.05$);但是,在 SAH 后 48h,逐渐恢复正常($P>0.05$)。NS 组无明显神经行为异常表现(表 3)。

3 讨 论

为探讨 SAH 后的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。目前,SAH 模型

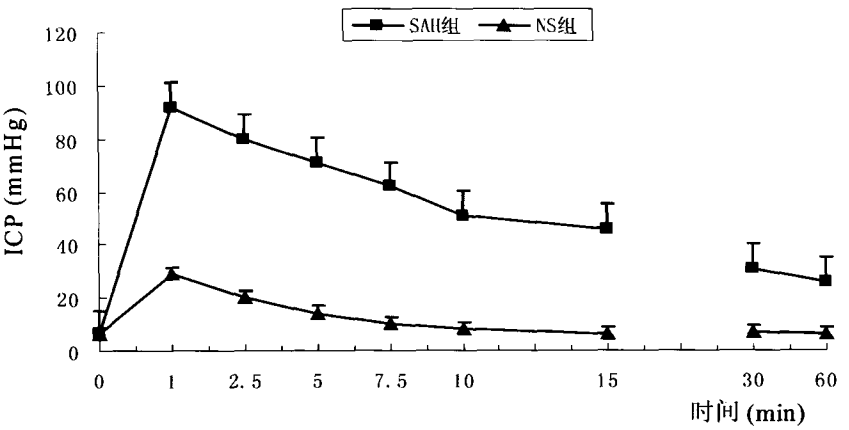


图 2 SAH 组和 NS 组大鼠 CIP 的动态变化

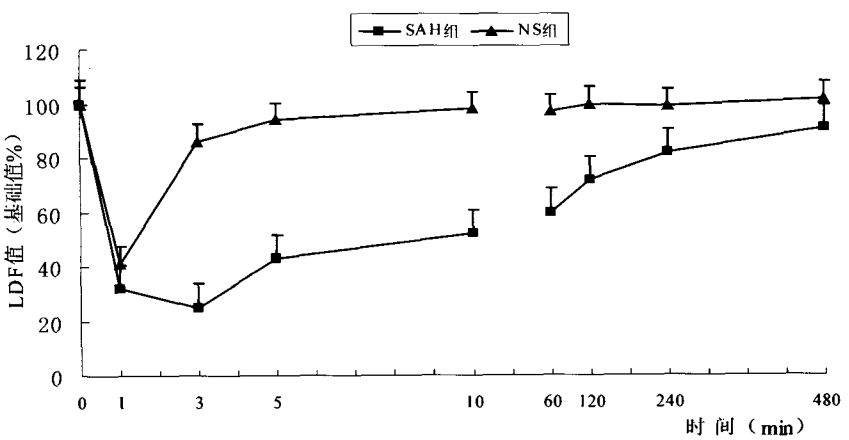


图 3 SAH 组和 NS 组大鼠 rCBF 的动态变化

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 SAH 组和 NS 组大鼠术前术后神经行为学评估结果

	SAH 组	NS 组
术前	11	11
术后 24 h	10.22 ± 0.67*	11
术后 48 h	11	11

* 与 NS 组比较,$P<0.05$

的建立方法可分为两大类:一类为颈内动脉穿刺法,即经颅或血管内刺破颅底大动脉造成 SAH。该模型具有血管损伤、颅腔保持完整等优点,似乎最能模拟动脉瘤破裂,反应 SAH 的临床状况;但是由于出血速度和出血量难以控制、出血严重程度变异大、颅内出血发生率及死亡率高,而且无法设置对照组,另外颈外动脉的结扎可能导致局部脑缺血[3,4]。另一类型是脑池注血法,即抽取动物自体动脉血液,注入蛛网膜下腔,其中最常见的是枕大池注血法。由于血液主要分布在后颅窝和脊髓蛛网膜下腔,与临床 SAH 血液分布不一致,同时可能压迫脑干导致死亡率增加[5]。

本研究采用视交叉前池注血法建立 SAH 模型,监测结果显示大鼠 SAH 后生理学各项参数变化不大,表明大鼠在手术过程中生命体征平稳,且能耐受此手术。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[6]。从脑大体标本可以看出,血液主要分布在前颅窝底和基底池,这与临床 SAH 血液分布相似。此外,该模型避免了复杂的外科操作和出血程度变异大的缺点,操作时间不超过 30min,重复性好,死亡率低。

一个理想的动物模型应该模拟临床 SAH 的病理生理学改变。为此,本研究采用 LDF 监测 rCBF 变化。LDF 是目前唯一能实时监测 rCBF 变化的技术,它能精确反映 rCBF 的动态变化[7]。根据 ICP、rCBF的监测结果,我们观察到 SAH 导致 rCBF2 次明显下降。第 1 次 rCBF 下降出现在 SAH 后 1min,可能是由于注血后引起急性 ICP 增高和脑灌注压(Cerebral perfusion pressure,CPP)降低所致。第 2 次 rCBF 进一步降低发生在 SAH 后 3min,这可能与 SAH 诱导的脑血管痉挛(Cerebral vasospasm,CVS)和脑代谢活动减少等多种因素密切相关。众所周知,SAH 后 CVS 常引起迟发性缺血性神经功能障碍(Delayed ischemic neurological deficit,DIND),而且,后者是 SAH 致残和致死的主要原因[8]。本研究通过对大鼠进行神经行为学评估,观察到 SAH 后 24h 大部分大鼠出现轻度的神经行为异常,这可能系 rCBF 减少进而引起脑缺血。然而,在 SAH 后 48h,大鼠并未表现出明显异常的神经行为学变化,表明该模型并未引起迟发性缺血性脑损伤。尽管 SAH 动物模型可以诱发 CVS,但是,SAH 模型究竟能否引起 DIND 仍存在着分歧[9]。这也是采用 SAH 模型来研究 DIND 时值得思考的问题。虽然本模型仍未完全满足理想的 SAH 模型的要求,但是,根据 ICP、rCBF 的动态变化,我们认为,视交叉前池注血法模型更能模拟动脉瘤性 SAH 的病理生理学状态,适合于 SAH 后病理学和病理生理学的研究,尤其是前循环动脉瘤性 SAH 的研究。

迄今为止,SAH 病理生理学机制未完全阐明,SAH 仍是神经科医生面临的难题。因此,不断寻找和建立一种趋于完美的 SAH 动物模型,对深入研究 SAH 病理生理学和 CVS 机制及其治疗研究具有重要意义。

参 考 文 献

[1] van Gijn J,Kerr RS,Rinkel GJ. Subarachnoid hemorrhage[J]. Lancet,2007;369(9 558):306-318.

[2] Kaoutzanis M,Yokota M,Sibilia R,et al. Neurologic evaluation in a canine model of single and double subarachnoid hemorrhage[J]. J Neurosci Methods,1993;50(3):301-307.

[3] Schwartz AY,Masago A,Sehba FA,et al. Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat:a refinement of the endovascular filament model[J]. J Neurosci Methods,2000;96(2):161-167.

[4] Bederson JB,Germano IM,Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorhage *in* the rat[J]. Stroke,1995;26(6):1086-1092.

[5] Megyesi JF,Vollrath B,Cook DA,et al. *In* vivo animal models of cerebral vasospasm:A review[J]. Neurosurgery,2000;46(2):448-461.

[6] Velthuis BK,Rinkel GJ,Ramos LM,et al. Subarachnoid hemorrhage: aneurysm detection and preoperative evaluation with CT angiography[J]. Radiology,1998;208(2):423-430.

[7] Tonnesen J,Pryds A,Larsen EH,et al. Laser Doppler flowmetry is valid for measurement of cerebral blood flow autoregulation lower limit in rats[J]. Exp Physiol,2005;90(3):349-355.

[8] Dreier JP,Woitzik J,Fabricius M,et al. Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations[J]. Brain,2006;129(12):3 224-3237.

[9] Ergün R,Fernandez J,Misra M,et al. Endoscopic technique:a new model of subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Neurol Res,2001;23(6):627-630.

(责任编辑:谭乐勤)