

. 实验研究 .

脑皮层扩散性抑制对大鼠蛛网膜下腔出血后皮层微循环的影响

余德源 唐 跃 黄 钦 温健鹏 刘 鹏

【摘要】目的 探讨脑皮层扩散性抑制(CSD)对蛛网膜下腔出血(SAH)模型小鼠脑皮层微循环的影响。**方法** 将30只雄性成年C57小鼠随机分为正常组($n=10$,制作透明颅窗、诱导窗加KCl)、对照组($n=10$,制作透明颅窗及SAH模型、诱导窗加NaCl)和观察组($n=10$,制作透明颅窗及SAH模型、诱导窗滴KCl)。采用颈动脉内穿刺法构建SAH模型。使用激光散斑血流成像和内源信号成像技术记录脑皮层微循环和CSD。**结果** 观察组、正常组出现CSD,对照组未产生CSD。观察组CSD后脑皮层血流明显下降($P<0.05$)、血管明显收缩($P<0.05$),其中CSD后5 d较显著。正常组CSD后血管明显舒张($P<0.05$)、皮层血流明显增加($P<0.05$)。对照组无明显变化($P>0.05$)。**结论** KCl能诱导产生CSD;CSD能使正常小鼠脑皮层血流增加和血管扩张;CSD使SAH后脑皮层血流减少和血管收缩。

【关键词】 蛛网膜下腔出血;皮层扩散性抑制;激光散斑技术;内源信号成像技术;小鼠

【文章编号】 1009-153X(2019)06-0352-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.9

Observation of effects of cortical spreading depression on cortical microcirculation after subarachnoid hemorrhage under transparent cranial window

SHE DE-yuan^{1,2}, TANG Yue², HUANG Qin³, WEN Jian-peng², LIU Peng^{1,2}. 1. School of Medicine, Wuhan University of Sciences and Technology, Wuhan 430065, China; 2. Department of Neurosurgery, General Hospital, Central Theatre, PLA, Wuhan 430070, China; 3. Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Wuhan 430074, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of cortical spreading depression (CSD) on the cortical microcirculation after subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** Thirty C57 male mice were randomly divided into 3 groups of 10 animals each, i. e. normal group in which the transparent cranial windows were made and KCl dropped into the cranial window, control group in which the transparent cranial windows and SAH models were made and the physiological saline dropped into the window and experimental group in which the transparent cranial windows and SAH models were made and KCl dropped into the window. CSD and the cortical microcirculation was recorded by laser speckle blood flow imaging and endogenous signal imaging technology. **Results** ①CSD appeared in the experimental group and the normal group, but not in the control group. ②Compared to those before dropping the reagent, the cerebral cortical blood flow significantly decreased ($P<0.05$) and the cortical blood vessels significantly constricted, especially the 5th day after SAH in the experimental group ($P<0.05$), the cortical blood vessels significantly dilated ($P<0.05$) and the cortical blood flow significantly increased ($P<0.05$) in the normal group and the cortical blood vessels and blood flow were insignificantly changed in the control group ($P>0.05$) after dropping the reagent. **Conclusions** ①KCl can induce CSD in the normal and SAH mice cortices. ②CSD can induce the increase in the cerebral blood flow and vasodilatation in normal mice cortices. ③CSD can induce the decrease in the blood flow and vasoconstriction in the SAH mice cortices.

【Key words】 Subarachnoid hemorrhage; Cortical spreading depression; Laser speckle technology; Endogenous signal imaging; Cerebral blood flow

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.06.011

基金项目:国家自然科学基金(81870945);中国博士后科学基金(2018M641411);湖北省卫生与计划生育委员会科研联合项目(WJ2018H0065)

作者单位:430065 武汉,武汉科技大学医学院(余德源、刘 鹏);430070 武汉,中国人民解放军中部战区总医院神经外科(余德源、唐 跃、温健鹏、刘 鹏);430074 武汉,武汉国家光电实验室(黄钦)

通讯作者:刘 鹏,E-mail:5564793@qq.com

皮层扩散性抑制(cortical spreading depression, CSD)为大脑皮层对各种有害刺激的反应,是皮层大量神经元去极化合并离子稳态失衡的结果^[1]。研究表明,CSD在蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后早期和晚期都有发生,并参与早期脑损伤和晚期迟发性缺血性神经功能障碍(delayed ischemic neurologic deficit, DIND)的病理过程。本文利用小鼠SAH模型创建稳定可靠的透明颅窗,使用激光散斑血流成像和内源信号成像技术

连续动态观察 CSD 对 SAH 后皮层微循环的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 将 30 只雄性 C57 小鼠(体重 20~25 g,全部采购于湖北省疾病预防控制中心)随机分为正常组、对照组、观察组,每组 10 只。三组分别制作透明颅窗,正常组诱导窗滴 KCl;对照组制作 SAH 模型、诱导窗滴 NaCl;观察组制作 SAH 模型、诱导窗滴 KCl。观察小鼠建模后 1、3、5、7、14 d CSD 情况,同时观察脑皮层微循环变化。

1.2 SAH 模型的建立 采用颈动脉内穿刺法^[2]构建 SAH 模型。小鼠通过 1:3 的氧气与异氟烷进行麻醉后,固定于手术台。作颈部正中切口,体视学显微镜下逐层分离皮下组织,暴露颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA)。活结结扎 ICA、CCA,牢固结扎 ECA。从 ECA 结扎近心端将一根 5-0 穿刺线经 ECA 插入 ICA,在穿刺入口近心端结扎,从 ECA 两个结扎端离断 ECA。旋转穿刺线,使穿刺方向由 ICA 至 CCA,随后将穿刺线往前推送至有轻微阻力感(约 20 mm),接着前进 1~2 mm,直到刺破大脑中动脉和大脑前动脉分叉处,迅速将尼龙线拔出。

1.3 小鼠透明颅窗及 CSD 诱导窗的制作 小鼠眼球涂抹红霉素,俯卧位固定在脑立体定向仪上,通过一个反馈式的加热垫维持体温在(37±0.5)℃。作顶部正中矢状线切口,逐层暴露颅骨。在顶骨(避开冠状缝、矢状缝)选取一个大小约为 3 mm×3 mm 的区域,用牙科钻将此区域磨薄至均匀透明状(用水湿润后皮层血管清晰可见),磨薄后的颅骨厚度约为 100 μm。在同一侧额骨,用牙科钻钻孔(孔径 1 mm×1 mm,为诱导 CSD 窗口),保持硬脑膜完整(图 1)。使用玻片覆盖,周围使用骨水泥填塞进行窗的保护。

1.4 诱导 CSD 的方法 采用 KCl 诱导。用显微注射器抽取 1 mol/L(双蒸水配置,高温高压灭菌)的 KCl 溶液 1 μl 从诱导窗中注入皮层,深度约 2 mm。对照组诱导窗内加入 1 μl 生理盐水。散斑图像和内源图像有动态变化,则成功诱导 CSD 后;没有动态变化,则未诱导成功。

1.5 激光散斑血流成像和内源信号成像 模型制作后第 1 天对小鼠诱导前后 10 min 内的变化进行成像,记录实验图像,并分析相关数据。散斑成像:将小鼠连同脑立体定向仪摆放在激光散斑成像处,使半导体激光器光源发出激光经过透镜组扩束整形后

的均匀光斑以一定的倾斜角照射在慢性观察窗表面,记录实时图像 600 s。内源信号成像:将 Baumer 相机接头连接至内源成像孔,调节仪器、参数,记录实时图像 600 s。在图像记录的过程中,从诱导窗加入 1 μl KCl,继续观察记录图像。以后分别于模型建成后第 3、5、7、14 d 各重复以上实验一次。成像过程中利用散斑软件计算同一处皮层微动脉血管管径及同一区域局部脑血流量(regional cerebral blood flow, rCBF)。采用 MATLAB 软件进行分析。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件分析,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析;采用 Pearson 相关系数分析相关性,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 全脑标本肉眼观察 观察组、对照组小鼠均可以观察到蛛网膜下腔内存在血液(图 2a),可以证实颈内动脉穿刺法制造模型成功。正常组未见蛛网膜下腔出血(图 2b)。

2.2 内源信号成像下 CSD 波形图 在内源下观测 CSD 发生的过程,形成的图像利用 MEATLAB 加以分析,得出正常组 1、3、5、7、14 d 所诱导的 CSD 波形图(图 3)。波形基本变化表现为上升、下降、上升,最后波幅远高于基线以上的过程,与波长在 600 nm 以下内源光下第一波 CSD 的特征基本一致。观察组在 1、3、5、7、14 d 所诱导的 CSD 波形图(图 4),基本变化大致表现为上升、下降、上升的三相变化,但最后的波幅在基线以下或是略微高于基线,类似于第一波但不完全相似;有的也表现为下降、上升、下降、上升的

表 1 各组小鼠 CSD 诱导前后血管管径的变化(μm)

组别	诱导前	诱导后
对照组	9.44±1.53	9.42±1.34
正常组	11.35±0.14	12.87±0.32*
观察组	9.21±1.27	7.08±1.64*

注:与对照组相应值比,* $P < 0.05$;CSD. 皮层扩散性抑制

表 2 各组小鼠 CSD 诱导前后 rCBF 变化(ml/min)

组别	诱导前	诱导后	变化幅度(%)
对照组 5 d	44.26±2.36	43.07±1.34	-1.19±3.25
对照组 7 d	52.14±3.14	51.06±3.21	-1.08±2.35
正常组 5 d	86.64±3.24*	112.45±2.35**	31.79±6.25
正常组 7 d	88.43±2.54*	115.16±4.31**	32.64±7.56
观察组 5 d	42.13±2.46*	20.32±4.36**	-51.76±6.76
观察组 7 d	51.68±3.28*	28.14±3.26**	-45.54±8.31

注:与对照组相应值比,* $P < 0.05$;与诱导前相应值比,# $P < 0.05$;CSD. 皮层扩散性抑制;rCBF. 局部脑血流量

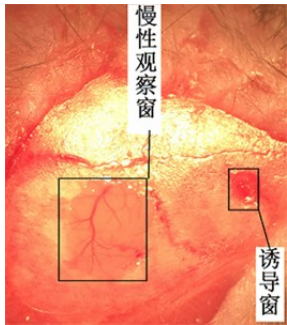


图1 颅骨观察窗
磨薄至均匀透明3 mm×3 mm 的
区域;诱导窗孔径1 mm×1 mm

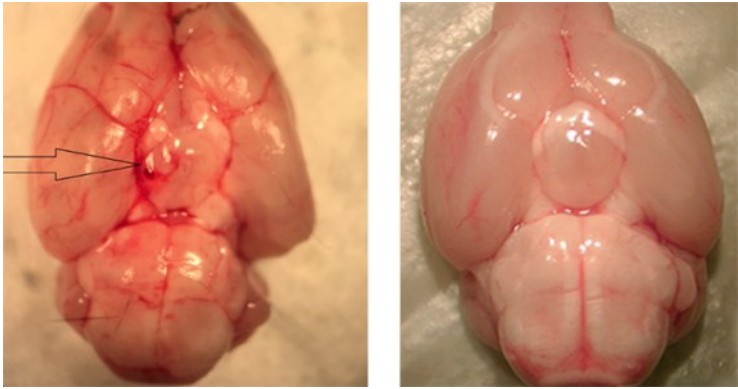


图2 全脑标本肉眼观察图,↑示穿刺线刺穿部位

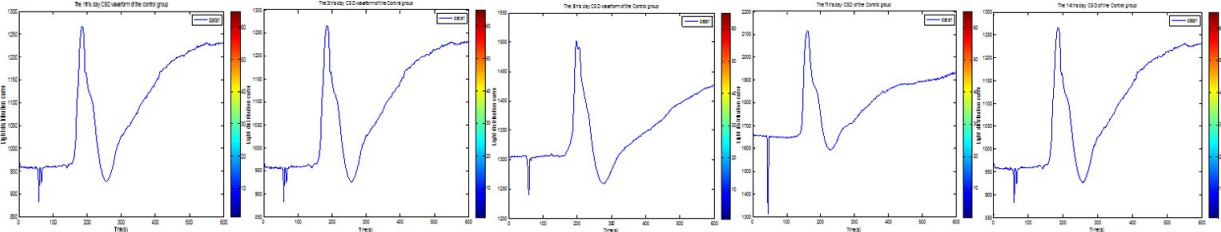


图3 利用MATLAB软件处理后得出的正常蛛网膜下腔出血后1、3、5、7、14 d KCl诱导产生的CSD波形图

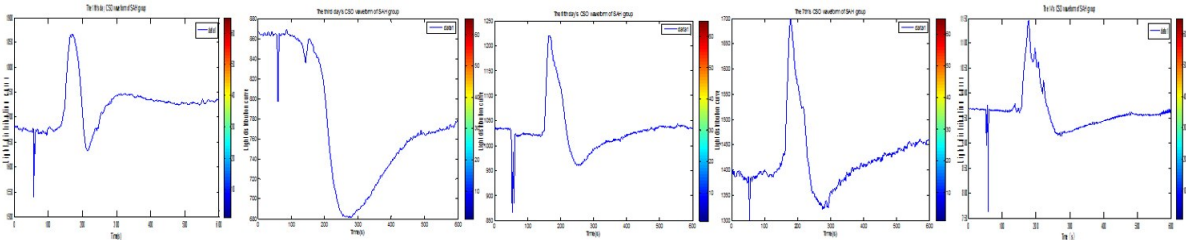


图4 利用MATLAB软件处理后得出的观察蛛网膜下腔出血后1、3、5、7、14 d KCl诱导产生的CSD波形图

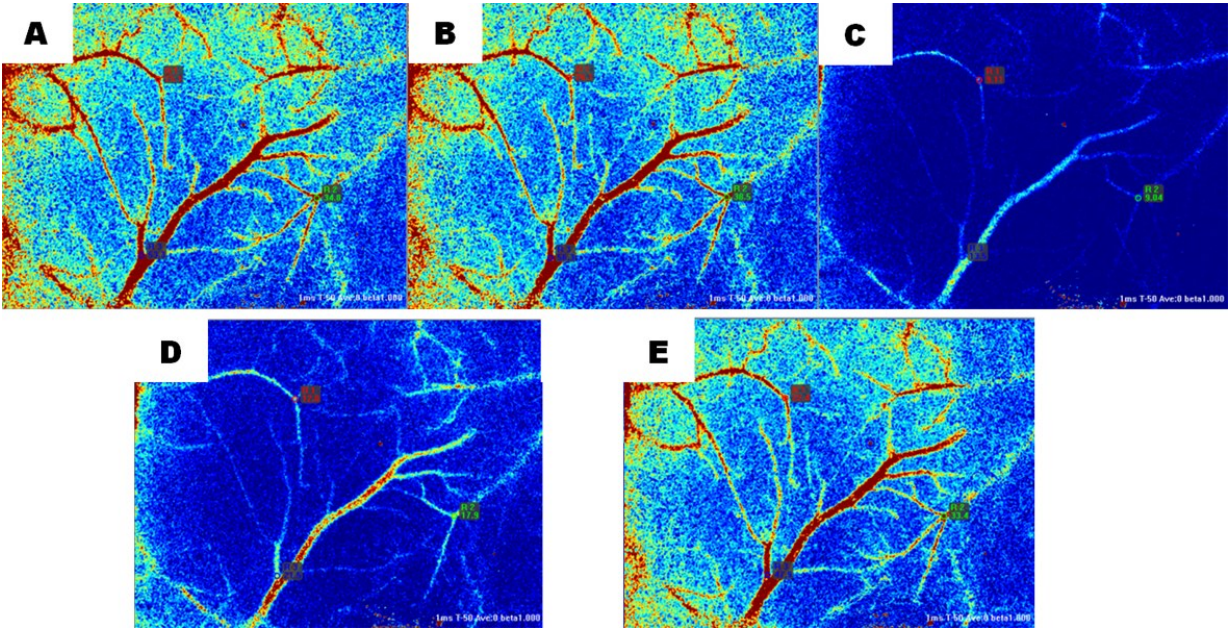


图5 激光散斑血流成像观测一次CSD过程中不同时相层血流图

A. 诱导前(0~1 min);B. 诱导后血管短暂舒张期(1.5~2 min);C. CSD 血管强烈收缩期(2~4 min);D. CSD 血管收缩恢复期(4~15 min);E. 恢复到诱导前;红色、绿色、蓝色点数值表示该处血液流速值

四相变化,最后波幅明显低于基线,类似于第二次 CSD 过程。与正常组相比,观察组图形的改变能反映:小鼠 SAH 后可能存在 CSD,以至于诱导不出第一波 CSD 波形,诱导的波形是类似于第二波 CSD 以及第二波以后的 CSD。对照组用 NaCl 诱导未产生 CSD,波形图表现为一条直线,皮层没有电位变化。

2.3 散斑下脑皮层血流图 激光散斑图颜色越红代表该处血流速度越快,越蓝代表该处血流速度越慢,再结合血管管径从而得出该处脑血流量,正常小鼠诱导 CSD 后脑血管典型变化见图 5。

2.4 各组血管管径、rCBF 的变化 对照组小鼠诱导前后血管管径变化不明显($P>0.05$);正常组小鼠诱导 CSD 后血管管径较前明显增大,与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$);观察组小鼠诱导 CSD 后血管管径较前出现收缩,与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

对照组小鼠诱导前后 rCBF 无明显变化($P>0.05$)。正常组小鼠 CSD 后 rCBF 较诱导前明显增加($P<0.05$)。观察组小鼠 CSD 前后相应值与对照组比较均明显减少($P<0.05$)。观察组 5、7 d CSD 前后相比 rCBF 均值明显减少($P<0.05$),最低值在第 5 天,之后开始恢复。见表 2。

3 讨论

脑血管痉挛是 SAH 后导致 DIND 的主要原因,严重影响病人预后;然而针对迟发性脑血管痉挛的治疗措施并不能有效预防 DIND^[3]。近几年研究发现,SAH 后早期脑损伤(early brain injury, EBI)可能是引起 SAH 不良预后的首要原因,及时有效地对 EBI 进行治疗和干预,成为提高 SAH 病人生存率和改善病人预后的重要手段^[4]。研究表明,EBI 和 DIND 的机制中都与去极化波的形成相关,这种波导致脑血流减少,能量衰竭,组织缺氧,加重脑损伤,这种去极化波就是 CSD^[5]。CSD 是指神经元和神经胶质细胞产生去极化,并且这种去极化传播至周围的神经组织,随后导致自发神经活动被抑制的现象。本文应用激光散斑成像技术监测 SAH 前后及不同病程中的脑皮层微循环改变,并且同时采用内源信号光学成像实时追踪 CSD 的动态变化过程,结果发现 SAH 后明显出现自发性 CSD,持续 14 d;而且, CSD 会导致 SAH 后脑皮层血流下降、血管收缩;而正常生理情况下, CSD 会使脑血流量增加, SAH 后 CSD 引起脑血流量减少。研究表明,脑损伤、脑缺血和 SAH 都会发生 CSD,高达 75% 的 CSD 发生在动脉瘤

性 SAH 后 5~7 d 内。在 SAH 病人脑组织中,皮层扩散性去极化减少脑血流,导致能量的衰竭,组织缺氧,加重脑损伤^[6]。关于 SAH 后 CSD 的产生及改变机制,可能是 SAH 后血管收缩引起的脑血流降低、葡萄糖含量下降以及促凝血因子水平的增加,血小板聚集导致微栓子产生而出现的小的缺血灶,诱发皮层扩散性去极化^[7]。另外, SAH 后皮层大量神经元除极引起细胞钠离子和钙离子内流增加,细胞外钾离子升高,产生 CSD,诱导神经细胞死亡^[8]。同时, CSD 的发生会改变 SAH 的病理生理过程,因为 CSD 的发生伴有大量胞内外离子的再分布,恢复可导致氧和葡萄糖消耗增加, CSD 的细胞毒性和血管收缩作用与出血的直接缺血效应协同作用,也可能是导致 SAH 后 CSD 的发生并影响 SAH 病理生理。

【参考文献】

[1] Leao APP. Spreading depression activity in the cerebral coltex [J]. J Neurophysiol, 1944, 7: 359-390.

[2] Carl M, Masayuki F, Kazuo O, *et al.* Filament perforation model for mouse ubarachnoid hemorrhage: Surgical-technical considerations [J]. Brit J Neurosurg, 2014, 28(6): 722-732.

[3] Sehba FA, Pluta RM, Zhang JH. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury [J]. Mol Neurobiol, 2011, 43(1): 27-40.

[4] 何骏驰, 罗良生. 动脉瘤性蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的研究进展[J]. 东南大学学报 医学版, 2015, 34(2): 308-312.

[5] Sehba FA, Hou J, Pluta RM, *et al.* The importance of early braininjury after subarachnoid hemorrhage [J]. Prog Neurobiol, 2012, 97(1): 14-37.

[6] Dreier JP, Major S, Manning A, *et al.* Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients withaneurysmal subarachnoid haemorrhage [J]. Brain, 2009, 132(Pt7): 1866-1881.

[7] Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, *et al.* Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence [J]. Ann Neurol, 2008, 63(6): 720-728.

[8] Dreier JP, Major S, Manning A, *et al.* Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage [J]. Brain, 2009, 132 (Pt7) : 1866-1881.

(2019-03-09 收稿, 2019-04-18 修回)