

. 实验研究 .

激光散斑成像法监测格列本脲对小鼠SAH后脑微循环的影响

刘 鹏 唐 跃 余德源 马廉亭 潘 力 何 川

【摘要】目的 探讨格列本脲对小鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后脑微循环的影响。**方法** 将28只雄性C57小鼠随机分为对照组(n=6)、SAH组(n=6)、溶媒组(n=6)和格列本脲组(n=10)。视交叉前池注入自体非抗凝尾动脉血60 μl建立SAH模型。小鼠SAH后5 min内,格列本脲组腹腔注射格列本脲(25 μg/kg),溶媒组腹腔注射等体积二甲基亚砜;SAH组未进行任何治疗。造模后12 h,应用Garcia量表评分评估神经功能;造模前后使用激光散斑血流成像监测脑皮层灌注以及体感刺激下感觉皮层血流响应幅度。**结果** 造模后12 h,SAH组、溶媒组神经功能评分明显下降($P<0.05$),脑感觉皮层灌注明显下降($P<0.05$),体感刺激下感觉皮层血流响应幅度明显下降($P<0.05$)。应用格列本脲后,小鼠神经功能评分明显增高($P<0.05$),脑感觉皮层血流响应幅度和感觉皮层灌注明显改善($P<0.05$)。**结论** 格列本脲可以改善小鼠SAH后神经功能,可能与改善脑微循环有关。

【关键词】 蛛网膜下腔出血;感觉皮层灌注;血流响应;格列本脲;激光散斑成像;小鼠

【文章编号】 1009-153X(2020)08-0538-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.9

Effects of glibenclamide on cerebral microcirculation after subarachnoid hemorrhage in mice

LIU Peng¹, TANG Yue², SHE De-yuan², MA Lian-ting², PAN Li², HE Chuan¹. 1. Department of Neurosurgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China; 2. Department of Neurosurgery, General Hospital of Central Theater Command, PLA, Wuhan 430070, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of glibenclamide on the cerebral microcirculation after subarachnoid hemorrhage (SAH) in mice. **Methods** Twenty-eight male C57 mice were randomly divided into control group (n=6), SAH group (n=6), vehicle group (n=6) and glibenclamide group (n=10). The SAH model was established by injecting 60 μl of autologous non-anticoagulated tail artery blood into the anterior cisterna. Within 5 minutes after SAH, the mice in the glibenclamide group were intraperitoneally injected with glibenclamide (25 μg/kg), the mice in the vehicle group were intraperitoneally injected with the same volume of dimethyl sulfoxide, and the mice in the SAH group received no treatment. Twelve hours after SAH, the Garcia scale was used to evaluate neurological function; laser speckle blood flow imaging was used to monitor cerebral cortex perfusion and the response amplitude of sensory cortex blood flow under somatosensory stimulation before and after SAH. **Results** After SAH, the neurological function score was significantly decreased ($P<0.05$), the cerebral sensory cortex perfusion was significantly decreased ($P<0.05$), and the sensory cortex blood flow response amplitude was significantly decreased under somatosensory stimulation ($P<0.05$). After the application of glibenclamide, the neurological score was significantly increased ($P<0.05$), and the blood flow response amplitude and perfusion of the sensory cortex of the brain were significantly improved ($P<0.05$). **Conclusion** Glibenclamide can improve the neurological function of mice after SAH, which may be related to the improvement of cerebral microcirculation.

【Key words】 Subarachnoid hemorrhage; Cortical perfusion; Blood flow response; Glibenclamide; Laser speckle imaging; Mice

蛛网膜下腔出血(subarachnoidhemorrhage,

SAH)伴发的脑损伤可导致17%~40%的病人死亡或残疾^[1,2]。因此,减轻SAH后脑损伤,可改善SAH病人预后。格列本脲可减轻缺血性卒中后脑水肿,并改善神经功能^[3,4]。本文采用激光散斑血流成像法分析格列本脲对小鼠SAH后脑微循环的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 将28只雄性C57小鼠(8周龄,体重25~30g,SPF级,购自湖北省疾控中心)随机分为对照组(6只)、SAH组(6只)、溶媒组(6只)和格列

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.08.013

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:100053 北京,首都医科大学宣武医院神经外科(刘 鹏、何 川);430070 武汉,中国人民解放军中部战区总医院神经外科(唐 跃、余德源、马廉亭、潘 力)

通讯作者:何 川,E-mail:streamhe@163.com

潘 力,E-mail:plainfat@163.com

本豚组(10只)。所有实验程序均遵守国家动物伦理福利的相关规定。

1.2 观察窗的建立 将麻醉后小鼠(3%异氟烷诱导,2%异氟烷维持)置于立体定向框架上,反馈式加热垫将体温保持在 $(37\pm0.5)^{\circ}\text{C}$ 。头部中线切开后暴露完整颅骨,在生理盐水持续滴注下用高速牙科钻将右侧感觉皮层上方颅骨(距冠状缝2 mm、矢状缝5 mm)磨薄至透明,大小为2 mm \times 2 mm(图1)。

1.3 SAH模型的建立 采用视交叉前池注血法构建SAH模型^[5]。小鼠通过1:3的氧气与异氟烷进行麻醉后,固定于脑立体定向仪上,通过反馈式加热垫将体温维持在 $(37\pm0.5)^{\circ}\text{C}$ 。剔除头部毛发,沿中线暴露完整头骨,用高速牙科钻在前囟前方5 mm中线处钻一个0.7 mm的注血孔,27号注射器抽取非肝素化的尾动脉血60 μl 成30 $^{\circ}$ 角向尾部推进5.5 mm,在60 s内完成注入。骨蜡封闭注血孔,小鼠头部略向上放置10 min,使注入的血液可以流入Wills环。对照组仅建立观察窗。

1.4 药物干预方法 用二甲基亚砜制备格列本脲的储备溶液,浓度为1 mg/ml。小鼠SAH后5 min内,格列本脲组腹腔注射格列本脲(25 $\mu\text{g/kg}$),溶媒组腹腔注射等体积二甲基亚砜。SAH组未进行任何治疗。SAH后12 h分别行神经系统评分、感觉皮层灌注和体感刺激下感觉皮层血流响应数据采集。文献报道此剂量的格列本脲不会引起低血糖症^[6]。

1.5 激光散斑成像 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观察窗区域的脑皮层,使用安装在显微镜上的12位CCD摄像机,以100 fps(曝光时间 $T=10\text{ ms}$)获取LSI(640 \times 480像素),感兴趣区域随机放置在感觉皮层区域。脑感觉皮层灌注定义为造模前在感觉皮层(避免皮层血管区域)随机选择4个区域(为避免选择误差)连续采集60 s的血流速度作为基线脑皮层灌注($F_0=100\%$)。

1.6 前爪电刺激 A-M电刺激仪两根电极针分别插入小鼠的左前爪第2、3以及第4、5之间的皮肤下并妥善固定,参数设置为电流2.0 mA,脉宽0.3 ms,频率3 Hz。为避免急性痛觉刺激电极影响脑血流的影响,电极固定需在电刺激前10 min完成。

1.7 Garcia神经功能评分 由一名对分组不知情研究者使用Garcia量表对小鼠自发活动和刺激反应进行评估^[7],总共包括6个部分:自发活动(笼内5分钟),四肢的自发运动,前肢伸展,金属笼斜坡攀爬,躯干触觉反应和触须触觉反应。每个部分评分0~3分,

总分0~18分,分值越低代表神经功能受损越严重。
1.8 统计学分析 采用GraphPad 8.1.1软件分析;定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,行方差分析和 t 检验;以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察 视交叉前池注血后大量血液覆盖视交叉前池或Wills环(图2A),对照组未见血液(图2B)。

2.2 Garcia神经功能评分比较 对照组评分为18.00分。造模后12 h,SAH组、溶媒组、格列本脲组评分分别为 (11.34 ± 0.62) 分、 (11.55 ± 1.00) 分、 (13.50 ± 1.20) 分。造模后12 h,SAH组Garcia神经功能评分与对照组相比明显下降($P<0.05$);溶媒组Garcia神经功能评分与SAH组相比无明显改善($P>0.05$);格列本脲Garcia神经功能评分与溶媒组相比明显增加($P<0.05$)。

2.3 感觉皮层灌注比较 对照组脑感觉皮层灌注为100.00%。造模前,SAH组、溶媒组、格列本脲组脑感觉皮层灌注均为100.00%;造模后12 h,SAH组、溶媒组、格列本脲组脑感觉皮层灌注分别为 $(67.60\pm5.60)\%$ 、 $(66.62\pm4.65)\%$ 、 $(76.70\pm4.80)\%$ 。造模后12 h,SAH组感觉皮层灌注与对照组相比明显下降($P<0.05$);溶媒组感觉皮层灌注与SAH组相比无明显改善($P>0.05$);格列本脲脑感觉皮层灌注与溶媒组相比明显增加($P<0.05$)。见图3。

2.4 体感刺激下感觉皮层血流响应幅度比较 各组小鼠前爪电刺激后,出现体感功能区域局限性血流增加改变(图3)。对照组感觉皮层血流响应幅度为 $(34.75\pm2.41)\%$ 。造模后12 h,SAH组、溶媒组、格列本脲组感觉皮层血流响应幅度分别为 $(18.55\pm1.67)\%$ 、 $(17.92\pm4.50)\%$ 、 $(26.91\pm7.67)\%$ 。造模后12 h,SAH组感觉皮层血流响应幅度与对照组相比明显下降($P<0.05$);溶媒组感觉皮层血流响应幅度与SAH组相比无明显改善($P>0.05$);格列本脲脑感觉皮层血流响应幅度与溶媒组相比明显增加($P<0.05$)。见图4。

3 讨论

脑的功能活动离不开血流灌注。生理状态下,脑血管通过自我调节的方式维持脑组织正常血流灌注。为了维持脑组织的正常功能,脑组织局域性神经元激活与时间空间上局部血流增加和脑的代谢耗氧率紧密联系,脑的微循环受不同的中介系统和细

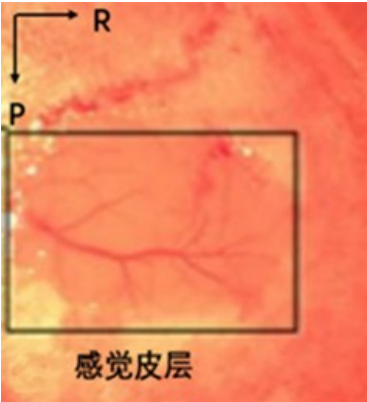


图1 感觉皮层观察窗

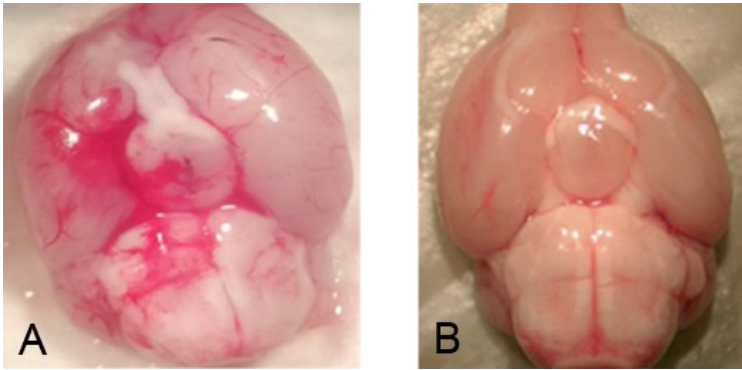


图2 全脑标本肉眼观察
A. 蛛网膜下腔出血小鼠;B. 正常小鼠

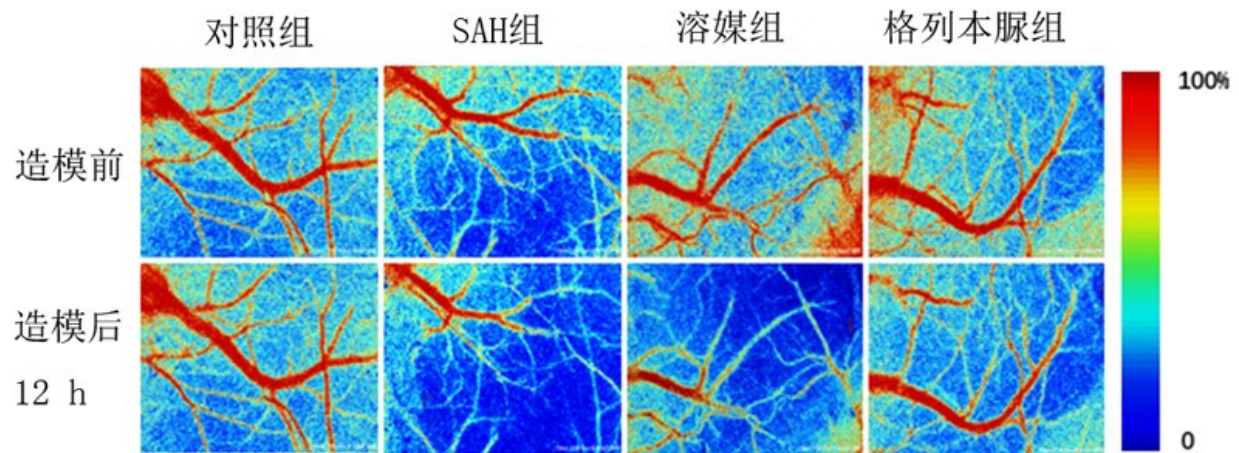


图3 激光散斑监测小鼠蛛网膜下腔出血后脑感觉皮层灌注

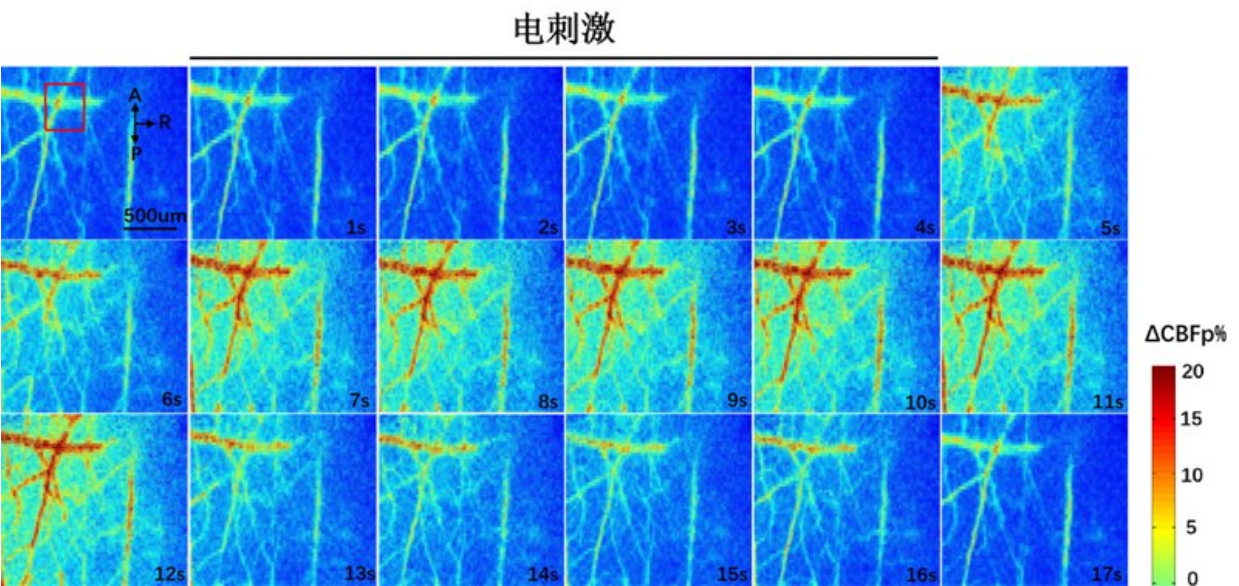


图4 小鼠蛛网膜下腔出血后体感刺激下血流变化图
黑色线条代表刺激;A. 前;P. 后;R. 右

胞调控,以满足激活神经元的能量需求,这一过程是通过神经血管偶联完成的^[8]。

研究提示,SAH病人存在脑血流量下降、脑缺血、氧利用下降甚至局部脑梗死的表现^[9]。颅内大血管痉挛曾被认为是诱发SAH后脑缺血、继而导致脑梗死和神经功能障碍的首要原因,但是CONSCIOUS-1临床研究表明抗血管痉挛治疗并不能显著改善SAH病人的临床预后^[10]。这提示SAH后缺血性脑损伤的主要血管床可能不是大血管而有可能是微循环。研究显示,SAH后血液的突然涌入不仅引起颅内压增加,而且进入脑组织的血液成分和凝血因子作为危险信号驱动炎症相关的细胞坏死、氧化应激和血栓炎症引起脑感觉皮层灌注下降及神经血管失偶联,进而导致体感刺激下感觉皮层血流响应幅度下降^[11,12]。当功能激活的皮层神经细胞无法得到足够血流供应时,氧气和能量的供给就会出现障碍,继而引起神经元线粒体能量代谢和神经递质的合成异常,最终导致脑功能障碍。

研究表明 Sur1-Trpm4 信号通路与出血性中枢神经系统损伤的病理密切相关,特别是与血管性水肿和神经炎症^[13,14]。格列本脲是 Sur1-Trpm4 信号通路抑制剂,具有抑制炎症反应、减轻脑水肿、减少梗死体积、减少神经元凋亡和出血转化等多重神经保护作用^[3,4]。本文结果表明格列本脲可以改善小鼠SAH后神经功能,增加脑感觉皮层灌注和体感刺激下感觉皮层血流幅度。这可能与格列本脲抑制 Sur1-Trpm4 信号通路,减轻脑水肿和神经炎症级联反应有关,随着颅内压的下降和炎症反应的减轻,微循环的血管阻力下降,脑皮层灌注增加,脑组织供血得到恢复,受损的神经血管单元逐渐修复,从而增加体感刺激下的血流响应幅度,当功能激活的皮层神经细胞能够获取更多氧气和能量供给时,神经功能受损就会减轻。

总之,我们的实验结果表明格列本脲可以改善SAH后小鼠的神经功能,可能与格列本脲改善SAH后脑微循环有关。

【参考文献】

[1] Dusick JR, Gonzalez NR. Management of arterial vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Semin Neurol, 2013, 33(5): 488-497.
[2] Suarez JJ, Tarr RW, Selman WR. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. N Engl J Med, 2006, 354(4): 387-396.

[3] Simard JM, Yurovsky V, Tsybalyuk N, *et al.* Protective effect of delayed treatment with low-dose glibenclamide in three models of ischemic stroke [J]. Stroke, 2009, 40(2): 604-609.
[4] Ortega FJ, Jolkonen J, Mahy N, *et al.* Glibenclamide enhances neurogenesis and improves long-term functional recovery after transient focal cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metabolism, 2013, 33: 356-364.
[5] Sabri M, Jeon H, Ai J. Anterior circulation mouse model of subarachnoid hemorrhage [J]. Brain Res, 2009, 1295: 179-185.
[6] Simard JM, Woo SK, Tsybalyuk N, *et al.* Glibenclamide-10-h treatment window in a clinically relevant model of stroke [J]. Transl Stroke Res, 2012, 3: 286-295.
[7] Matsumura K, Kumar TP, Guddanti T. Neurobehavioral deficits after subarachnoid hemorrhage in mice: sensitivity analysis and development of a new composite score [J]. J Am Heart Assoc, 2019, 8(8): e011699.
[8] Koide M, Sukhotinsky I, Ayata C, *et al.* Subarachnoid hemorrhage, spreading depolarizations and impaired neurovascular coupling [J]. Stroke Res Treat, 2013, 2013: 819340.
[9] Weidauer S, Vatter H, Beck J, *et al.* Focal laminar cortical infarcts following aneurysmal subarachnoid haemorrhage [J]. Neuroradiology, 2008, 50(1): 1-8.
[10] Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, *et al.* Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial [J]. Stroke, 2008, 39(11): 3015-3021.
[11] Balbi M, Koide M, Wellman GC, *et al.* Inversion of neurovascular coupling after subarachnoid hemorrhage in vivo [J]. J Cereb Blood Flow Metabolism, 2017, 37(11): 3625-3634.
[12] Koidea M, Boneva AD, Nelsona MT, *et al.* Inversion of neurovascular coupling by subarachnoid blood depends on large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (BK) channels [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(21): E1387-1395.
[13] Tosun C, Kurland DB, Mehta R, *et al.* Inhibition of the Sur1-Trpm4 channel reduces neuroinflammation and cognitive impairment in subarachnoid hemorrhage [J]. Stroke, 2013, 44(12): 3522-3528.
[14] Takano T, Tian GF, Peng W, *et al.* Astrocyte-mediated control of cerebral blood [J]. Nat Neurosci, 2006, 9: 260-267.

(2020-05-28 收稿, 2020-06-17 修回)