

大鼠脑血管病变观察及局部 脑缺血后梗塞灶的测定*

彭英** 黄如训 刘焯霖 卢锡林

(附属第一医院神经科)

提 要 用肾血管性高血压鼠,在光镜和透射电镜下,观察脑内小动脉壁和毛细血管壁结构的改变。通过血管铸型观察脑内侧支吻合血管的变化。并用 TTC 染色技术结合电子计算机图像分析系统定量测定局部脑缺血后不同时间的梗塞灶体积。结果发现,持续高血压使脑内小动脉壁发生玻璃样变性,毛细血管腔狭窄、基底膜增厚,微血管闭塞、退化,侧支吻合血管减少,局部脑缺血后,梗塞灶形成大且恢复差,进一步说明对脑卒中的预防首先应该是早期、积极有效地治疗高血压。

关键词 高血压;脑血管病;梗塞;大鼠

中图分类号 R 743

脑卒中最常见于高血压脑动脉硬化。因此,研究卒中前的脑血管病理变化对脑卒中的预防和治疗具有十分重要的意义。既往的脑卒中动物实验常用血压正常的健康动物,不仅脑血管正常,且与临床实际发病情况相差甚远。由于脑卒中动物模型的可行性、稳定性以及近似于人类脑卒中情况的程度关系到实验研究的意义和价值。为此,本实验用肾血管性高血压大鼠(RHR)分阶段动态观察脑血管病理变化以及脑侧支吻合血管的改变,并在此基础上复制局部脑缺血模型,定量测定缺血后不同时间梗塞灶的大小,以阐明脑血管损害在卒中发病中的作用。

材 料 和 方 法

RHR 模型复制 选用纯种、雄性、健康 SD 大鼠 110 只(广东省医用动物场提供),体重 $80 \times 120\text{g}$,鼠龄 2~3 月。随机分肾动脉狭窄手术组 53 只,非手术对照组 57 只。手术组按我们以前报道的方法^[1]。用内经 0.3mm

的银夹狭窄双侧肾动脉,用尾筒法测定鼠尾动脉收缩压,术前 3 d 连续所测血压的平均值为基础血压,术后每周测血压 1 次。

脑微血管病理观察 取高血压持续 1 周、5 周和 10 周 RHR 各 5 只,同龄对照鼠相应各 5 只。2.5%戊二醛混合固定液(10%多聚甲醛 4 ml, 25%戊二醛 2 ml, 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 10 ml, 无水氯化钙 25 mg 加双蒸水至 20ml)灌注固定,至上腔静脉流出清色固定液为止,迅速开颅取脑,在顶叶皮层取约 $3\text{mm} \times 2\text{mm} \times 2\text{mm}$ 大小的组织块,置于上述固定液中,2h 后切成 1mm^3 小块,继续固定 3 d。0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次,再用 1%四氧化锇后固定 1h,乙酰梯度脱水, Epon 812 渗透、包埋、超薄切片,铅、铀染色, H600 透射电镜观察毛细血管壁结构,并摄片。其余组织置于 10%福尔马林中固定,1 周后,行全脑冠状切片,每只脑切片 8~10 片,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,常规 HE 染色,光镜观察小动脉壁结构,并摄片。

脑侧支吻合血管的观察 通过血管铸型显露脑血管立体构筑,从而观察脑侧支吻合血管的变化,用高血压持续 1 周,5 周和 10 周 RHR 各 6 只,同龄对照鼠各 6 只,用预聚合

* 此文获我校第六届中青年学术论坛一等奖,第一作者为博士研究生,现在第一军医大学南方医院神经科工作

的甲基丙烯酸甲酯加少量苏丹Ⅲ做铸型剂。双侧颈内动脉插管,先用1%肝素生理盐水冲洗血管和1%戊二醛灌注固定后,再注入铸型剂(灌注压力恒定在19~20kPa)。断头取脑置于40%盐酸中腐蚀,1周后,在顶叶同一部位取1mm×2mm×2mm组织块,流水冲洗血管周围组织,干燥后在解剖显微镜下观察并清除残余组织,然后在H450扫描电镜下观察、摄片。

局部脑缺血后梗塞灶的定量测定 用高血压持续10周RHR 20只和同龄对照鼠24只复制局部脑缺血模型。20%乌拉坦按1g/kg腹腔麻醉,在手术显微镜下,暴露大脑中动脉主干后,给予双道结扎,术后24h和7d分别断头取脑(RHR各10只,对照组各12只),放入氯化三苯四唑(TTC)生理盐水中,37℃下孵育15min,脑表面正常组织染成红色,缺血组织成白色,速冻硬后行前脑冠状切片,于前脑额极后每2mm切一片,一只共5片再放入TTC生理盐水中,37℃下孵育30min,然后根据每片染色图像由电子计算机图像分析系统计算出各切片的面积和缺血损伤的面积,再根据各切片厚度计算出前脑体积和脑梗塞体积的近似值,以及梗塞灶占前脑体积的百分比。同时在顶枕区的缺血边缘区(前脑额极后约7mm),取1mm³脑组织块放入2.5%戊二醛混合固定液中,依前法电镜观察RHR和正常鼠缺血边缘区神经细胞的不同变化。

统计学处理 各组测定值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,配对计量资料比较用 t 检验,对多样本的各均数间差别行 q 检验,若方差不齐,则转用多个样本间两两比较的秩和检验,以 $P < 0.05$ 作为有显著性意义。

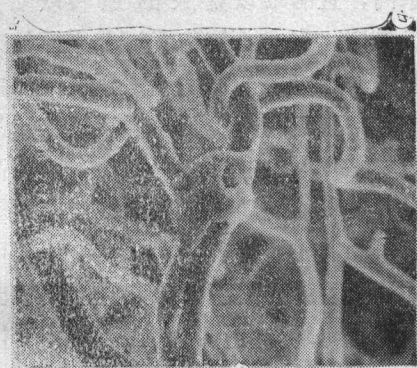
结 果

RHR 血压 所有53只行肾动脉狭窄手术鼠,术后第1周血压即开始上升,术后第5天由基础血压 12.21 ± 1.13 kPa上升到 15.11 ± 1.33 kPa,术后1~3周内血压上升较快,第3周时(术后20d),血压为 24.12 ± 1.09 kPa,显著高出术前血压($P < 0.01$),

且在第3周后血压逐渐平稳,波动减小,对照组血压无何变化,说明此时已形成稳定的肾血管性高血压,因此,将术后第3周称为RHR第1周,以后如此类推。

脑血管壁结构 光镜下,RHR第1周和第5周时,脑血管均未见明显改变。高血压持续10周时,可见皮下小动脉管腔狭窄,管周间隙增宽,管壁出现玻璃样变性。电镜下,RHR第5周时,可见毛细血管内皮细胞的线粒体肿胀,嵴减少,少数线粒体出现空化。高血压持续10周的RHR,可见毛细血管内皮细胞膜无规律凹陷和凸出,基底膜不规则,管腔可见细胞碎屑,有些管腔可见微血栓形成,管周胶质细胞皱缩,核染色质边积。

脑血管立体构筑 RHR第1周和第5周与同龄对照鼠无明显差异,表现为微动脉和微静脉长轴一致,均垂直于皮层表面,皮层表面血管吻合支丰富,在微动脉和微静脉之间的毛细血管直径较均匀,长度不一,互相吻合,互相缠绕成网,网眼大小不尽相同,密度大,走向复杂,而在RHR第10周鼠,可见皮层表面血管吻合支减少,毛细血管直径仍较均匀,并相互吻合成网,但毛细血管网明显稀疏,密度下降,并可见微动脉闭塞、退化和遗留的环形纹理(附图)。



附图 10周RHR脑内微血管铸形图
可见RHR脑内微动脉闭塞、退化和遗留的
环形纹理。扫描电镜($\times 870$)

局部脑缺血后梗塞灶的大小与变化 大脑中动脉闭塞后24h,从TTC染色结果来看,缺血区域主要是额、颞、顶和部分枕叶皮层及纹状

体外侧 2/3 区域, 其脑梗塞体积在缺血 24h, RHR 略大于正常对照鼠, 但无意义 ($P > 0.05$)。缺血持续 7d 时, RHR 明显大于对照鼠 ($P < 0.01$)。然而缺血第 7 天与 24 h 相比, 在 RHR 无何差异 ($P < 0.05$), 正常对照鼠的梗塞灶却明显缩小 (附表)。缺血 24 h, RHR 和正常鼠缺血边缘区神经细胞均出现

胞体肿大, 核膜凹凸不规则, 核染色质边积, 核周细胞器结构不清, 缺血第 7 天, RHR 缺血边缘区神经细胞坏死、液化。而在正常鼠缺血边缘区, 神经细胞仅有轻度缺氧改变, 表现为核膜皱缩, 但细胞器结构清楚, 核仁成圆形, 内质网周围附有丰富的核蛋白体。

附表 局部脑缺血后 NR 和 RHR 梗塞灶大小 ($\bar{x} \pm s$)

只数	梗塞灶体积 (mm^3)	前脑体积 (mm^3)	梗塞体积/前脑体积 (%)	
缺血 24h				
1.NR	12	172.16 ± 12.14	519.23 ± 31.78	34.8 ± 1.94
2.RHR	10	176.59 ± 23.03	500.07 ± 59.79	35.32 ± 2.41
缺血 7d				
3.NR	12	129.25 ± 19.15	504.19 ± 33.01	25.62 ± 2.38**
4.RHR	10	161.56 ± 23.19	503.36 ± 65.91	33.9 ± 0.68**

** 4:3 $t = 10.322$ $P < 0.01$ ** 3:1 $t = 11.184$ $P < 0.01$

讨 论

目前, 复制高血压动物模型的方法有很多, 国内外许多作者常直接使用由遗传因素所决定的自发性高血压大鼠 (SHR) 进行高血压的各种实验, 并在此基础上复制脑卒中动物模型^[2~4]。由于 SHR 来源有限, 价格昂贵, 饲养要求高, 且有难以克服的遗传缺陷^[5], 因此难以推广。本实验按作者以前报道的方法成功复制出稳定可靠的高血压大鼠模型, 由于手术简便, 大鼠来源广泛, 价格便宜, 易于饲养, 避免了 SHR 的遗传局限性, 可在高血压及其主要并发症的动物实验中广泛应用。

临床和实验研究表明, 长期高血压可引起颅内、外小动脉内膜下纤维素样物质节段性沉着, 随之动脉结构受损, 管壁玻璃样变性, 管腔狭窄, 严重时有微血栓形成^[6]。本研究, 在高血压持续 5 周时, 仅有毛细血管内皮细胞的线粒体肿胀, 嵴减少和空化等缺氧性改变, 高血压持续 10 周, 小动脉管腔变窄, 管壁出现玻璃样变性, 内皮细胞膜受损, 并有微血栓形成。这说明高血压对脑血管的损害是随着时间

的延长, 脑血管的病变由轻到重, 逐渐发展的。由于微血栓的形成, 脑内小分支血管网和侧支循环血管必定受到影响, 本实验通过血管铸型, 观察到脑血管立体构筑在高血压持续 10 周, 脑内毛细血管网稀疏, 密度明显下降, 皮层吻合支血管减少, 微动脉闭塞、退化。这就充分证明长期的高血压还损害脑内侧支循环。因此, 早期积极有效地防治高血压, 对预防脑卒中的发生具有非常重要的意义。

已有报道, 在 SHR 局部脑缺血后, 梗塞灶范围比正常鼠的大^[4,7]。我们用高血压持续一定时间的 RHR, 复制局部缺血模型, 经 TTC 组化染色后通过电子计算机图像分析系统对梗塞灶大小进行定量计算。TTC 能与细胞内的脱氢酶发生反应而呈现红色, 在代谢正常的细胞内, 脱氢酶活性高, 很易与之发生反应, 而在缺血缺氧的细胞内, 脱氢酶活性下降, TTC 不发生反应而呈白色。自 1986 年, Lundy 等^[8]首次用 TTC 染色技术作为确定大脑梗塞范围以来, 由于该技术具有经济、简便、客观、重复性好且能用电子计算机作梗塞体积计算等优点, 近年来, 国外学者常将其用

于脑梗塞的定量病理研究^[9-11]。本实验结果表明,缺血24h, RHR₁梗塞灶比正常鼠的稍大,但无统计学意义,这种梗塞灶形成略大的原因可能是高血压造成血管壁压力负荷增加,内皮细胞渗漏,使之对抗缺血的能力有所下降^[12]。在缺血持续7d时, RHR 梗塞灶明显大于正常鼠梗塞灶,且在正常鼠,其梗塞灶又小于缺血24h的梗塞灶。这就说明正常鼠不仅脑血管结构功能都正常,且具有良好的侧支循环,梗塞后,缺血边缘区能得到循环改善,使缺血区域缩小,缺血损伤的脑组织恢复好。而 RHR 由于脑血管结构的损害以及侧支吻合血管的减少,使脑的循环代偿能力下降,梗塞灶形成大且恢复差,本实验的脑血管病理和脑侧支吻合血管的观察结果恰好证明了这一点。

本研究结果说明,高血压对脑血管的损害是随时间的延长由轻到重,最后造成血管壁结构的破坏,微血栓形成和侧支吻合血管的减少。充分证明,脑缺血后,脑组织损伤的程度和恢复的好坏与高血压对脑血管及其侧支循环的破坏程度密切相关,所以对脑卒中的预防首先应该是早期积极有效地治疗高血压。同时提示我们,在抗卒中药物疗效观察的研究中使用无高血压,无脑血管病变的正常健康动物,其结果是不可靠的。由于临床脑卒中病人常伴有高血压动脉硬化,而 RHR 在脑缺血后,梗塞灶又相对恒定,用于脑卒中的病理生理机制以及抗卒中药物疗效评价的研究具有更实际的临床意义。

参 考 文 献

1. 黄如训,等.肾性高血压大鼠脑血管病变的初步观察.中国神经精神疾病杂志 1990; 16:136
2. Tagami M, et al. Permeability of intracranial extracerebral vessels in stroke-prone SHR. Stroke 1981;12:852
3. Bahner U, et al. Atrial natriuretic factor in specific brain areas of spontaneously

- hypertensive rats. Hypertension 1988; 12:519
4. Coyle P, et al. Cerebral infarction after middle cerebral artery occlusion in progenies of spontaneously stroke-prone and normal rats. Stroke 1984;11:711
5. Yamori Y. Predictive and preventive pathology of cardiovascular disease. Acta Pathol Jpn 1989;4:7
6. Nordbory C, et al. The morphometry of consecutive segments in cerebral arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. Stroke 1985;16:313
7. Duverger D, et al. The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: Influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration and age. J Cereb Blood Flow Metab 1988;8:449
8. Lundy EF, et al. Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils. J Pharmacol Methods 1986;16:201
9. Kano M, et al. Parasympathetic denervation of rat pial vessels significantly increase infarction volume following middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metab 1991;11:628
10. Izumi Y, et al. Reduction of infarct volume by magnesium after middle cerebral artery occlusion in rats. J Cereb Blood Flow Metab 1991;11:1025
11. Martz D, et al. Allopurinol and dimethylthiourea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke 1989;20:488
12. Hagakawa T, et al. Hypertension and acute focal cerebral ischemia infarction and edema [after occlusion of a middle cerebral artery in cats. Stroke 1979; 10:263

(1992-10-18收稿 1993-03-22修回)

