

大鼠脑局部星形细胞肿胀模型的 CT 灌注成像及病理学研究

胡凌, 高培毅, 袁芳, 徐立新

【摘要】 目的:研究脑局部星形细胞肿胀对局部脑血流的影响。方法:选取体重在 250~300 g 雄性 Wistar 大鼠 21 只,随机分为三组。将代谢型谷氨酸受体激动剂 tACPD(实验组)或生理盐水(对照组)2 μ l 注入右侧尾状核,6 h 及 24 h 后观察动物旋转运动情况,并行 CT 灌注成像检查后处死动物,测量左右尾状核干湿重并进行光镜和电镜观察。结果:实验组动物注射后 6 h 出现向对侧旋转运动,右侧尾状核水含量与对侧及对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$),CT 灌注成像均可见脑局部 rCBF、rCBV 明显下降,5 例 MTT 及 TTP 延长。光镜 HE 染色及电镜组织学检查可见星形细胞肿胀、小血管受压等改变。注射后 24 h 实验组动物旋转活动、CT 灌注成像及病理学检查均恢复正常。结论:星形细胞肿胀可引起局部脑血流量下降,CT 灌注成像可以清楚地反映局部脑血流动力学变化。当星形细胞肿胀恢复后,局部血流量可以恢复,CT 灌注指标亦恢复正常。

【关键词】 星形细胞; 体层摄影术, X 线计算机; 组织病理学

【中图分类号】 R814.42; R361.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2005)01-0007-04

CT Perfusion and Histopathology Research of Local Cerebral Astrocyte Swelling in Rats HU Ling, GAO Pei-yi, YUAN Fang, et al. Neuroimaging Center, Tiantan Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, P. R. China

【Abstract】 **Objective:** To evaluate the influence to cerebral local blood flow after astrocyte swelling. **Methods:** 21 male Wistar rats weighting from 250~300g were randomly divided into 3 groups: the contrast group, 6h and 24h group. In experimental group, tACPD (the agonist of mGluRs) was microinjected into the right caudatum. After 6 and 24 hours, the rotation per 5 minutes was calculated. Brain water content was measured by a wet/dry weight technique. Dynamic CT perfusion images were achieved from personal computer aided mapping. Histopathology study was performed by both light and electron microscopy. **Results:** The injection of tACPD induced brain edema after 6h. The swelling of astrocyte could be shown in both light and electron microscopy examination. In perfusion CT images all the animal showed the decrease of rCBF and rCBV, 5 of 7 showed the slowdown of MTT and TTP. In brain water content and rotation there were statistically significant difference between operated and contrast group, $P < 0.05$. In 24h group all the animals recovered to normal. **Conclusion:** Astrocytic swelling can induce or deteriorate decrease of cerebral blood flow, but when astrocytic swelling recovered, the cerebral blood flow recovered as well.

【Key words】 Astrocyte cell; Tomography, X-ray computed; Histopathology

星形细胞肿胀常见于脑缺血、脑外伤和癫痫持续状态等神经系统疾病。脑局部星形细胞肿胀与局部脑血流的关系目前尚不十分清楚。本研究通过立体定向方法向大鼠脑内注射代谢型谷氨酸受体激动剂 tACPD (trans-1-aminocyclopentane-1, 3-dicarboxylic acid) 来诱发细胞内钙离子增加, 建立脑局部星形细胞水肿动物模型, 并采用动态 CT 灌注成像对局部脑血流动力学的变化进行观察, 旨在探讨脑局部星形细胞肿胀对局部脑血流的影响。

材料与方法

实验用 Wistar 雄性大鼠由首都医科大学动物实

验中心提供, 体重 250~300g, 共 21 只, 随机分为三组, 每组 7 只。试剂 tACPD 购于 Sigma 公司(美), 溶解于 1 mol/l NaOH 及生理盐水中, 然后用 1 mol/l 浓度的 HCl 滴定至 pH7, 配成浓度为 0.25 mol/l 的 tACPD 溶液, 每只大鼠注射 2 μ l, 用量为 500 nmol。

大鼠尾状核注射: 10% 水合氯醛(400 mg/kg 体重, IP) 麻醉后, 将大鼠固定于立体定位架。依 Paxinos 及 Watson 大鼠脑立体定位图谱确定右侧尾状核的坐标为: 以前囟为中心, 向前 0.2 mm, 向右侧 2.9 mm, 深 6 mm, 垂直进针。用微量注射器于 2 min 内缓慢注入 2 μ l 液体, 注射器停留 5 min 后缓慢拔出。均注射于右侧尾状核, 实验组注入 tACPD, 对照组注入相同体积的生理盐水。实验组包括 2 组, 即注药后 6 h 观察组和 24 h 观察组:

旋转活动测定: 参考 Sacaan 等的方法^[1], 将大鼠放入直径 28 cm、高 17 cm 的不透光平底容器内, 记录

作者单位: 100050 北京, 天坛医院北京市神经外科研究所神经影像中心
 作者简介: 胡凌(1975—), 女, 山东花平县人, 博士, 主要从事神经影像学诊断工作。
 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370427); 北京市自然科学基金资助项目(7032009)

5 min 内的旋转圈数。以大鼠连续旋转 360°为 1 圈,向给药对侧方向旋转为正数,向相反方向为负数。

测量脑组织水含量:每组 4 只大鼠在 CT 检查后断头,立即取出双侧尾状核脑组织约 4~5 mm³,称取湿重并以 105℃烘干至恒重,通过以下公式计算:

$$\text{水含量}\% = \frac{\text{湿重}}{\text{湿重} + \text{干重}} \times 100\%$$

CT 灌注检查:模型制备成功后,将大鼠仰卧固定,剪开右后肢皮肤,暴露股静脉,静脉留置针穿刺成功后接高压注射器。CT 机型为 GE Light Speed,扫描参数:120 kV,100 mA,视野 9.6 cm×9.6 cm,层厚 3 mm。对比剂为碘海醇 300 mg I/ml,注射流率 0.5 ml/s,总量为 2 ml。扫描时,在注射对比剂的同时,取同一尾状核层面连续扫描获得大鼠脑冠状面图像 40 帧。经灌注软件处理后,获得脑血流量(rCBF)、脑血容积(rCBV)、峰值时间(TTP)及平均通过时间(MTT)伪彩图。将获得的各 CT 灌注参数采取半定量的计量方法,以右侧绝对值/左侧绝对值的形式表示。

病理学检查:每组取 3 只大鼠,取注射部位及对侧尾状核相应部位,行光镜 HE 染色及电镜检查。

统计学分析:实验数据均以“均数±标准差”的形式表示,采用 SPSS 6.0 进行多组均数比较方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

结 果

1. 旋转情况

所有大鼠麻醉前均未出现旋转现象。实验组大鼠从麻醉中清醒后,即出现身体向给药对侧弯曲的不对称姿势,行走时自发地向给药对侧旋转。6h 实验组大鼠旋转次数与对照组及 24h 实验组比较,差异有显著性意义(表 1)。

表 1 注射 tACPD 6h 后旋转次数

分组	只数	旋转次数(次/5min)
对照组	7	-1.23±0.65
6 h 组	7	17.14±9.12*
24 h 组	7	0.14±0.25

注:“-”表示大鼠向给药同侧旋转,*与对照组及 24 h 组比较, $P < 0.05$ 。

2. 脑组织水含量变化

tACPD 注射后 6 h 组脑局部水含量较对侧及对照组有明显增加,差异有显著性意义(表 2)。

表 2 注射 tACPD 脑水含量数据表 (%)

部位	对照组	6 h 组	24 h 组
右侧尾状核	60.54±1.45	70.27±0.95*	61.21±2.54
左侧尾状核	61.23±0.56	62.45±0.76	66.34±3.51

注:*与对照组、24 h 组及左侧尾状核比较, $P < 0.05$ 。

3. CT 灌注结果

CT 扫描结束后经灌注软件分析后,获得大脑 rCBF、rCBV、TTP 及 MTT 灌注图像。由于影响 CT 灌注图像的因素较多以及不同实验动物个体差异,灌注参数的绝对值往往并不可靠,所以本研究采用大脑双侧半球镜像位置的比值这种半定量的计量方式,由两名影像学医师分别测量每只实验动物右侧尾状核血流异常区及对侧镜像区域 rCBF、rCBV、MTT 和 TTP 数值各 3 次,以“均数±标准差”的方式表示(表 3)。

表 3 各组 CT 灌注参数表

分组	rCBF	rCBV	MTT	TTP
对照组	0.99±0.11	1.00±0.33	1.02±0.02	0.99±0.15
6 h 组	0.32±0.06*	0.45±0.26*	1.25±0.91	1.06±0.95
24 h 组	0.98±0.09	0.99±0.25	1.00±0.05	0.97±0.02

注:*与对照组、24 h 组比较, $P < 0.05$

CT 灌注图像可清晰显示脑局部血流量下降的范围和程度,并以伪彩显示(图 1)。CT 灌注图可见 tACPD 注射后 6 h 组,7 例均可见脑局部 rCBF、rCBV 明显下降,5 例 MTT 及 TTP 延长,其余 2 例 MTT 和 TTP 基本正常。对照组及注药后 24 h 组以上指标均未见明显改变。经统计学分析,组间 rCBF、rCBV 差异有显著性意义,MTT 及 TTP 组内变异较大,组间差异无显著性意义。

4. 病理学结果

实验 6 h 组右侧尾状核,于电镜及光镜下均可见星形细胞肿胀及微血管改变,其中电镜尤为敏感。电镜下,星形细胞肿胀主要表现为终板肿胀,胞浆内细胞器肿胀与变性,并可观察到肿胀的星形细胞终板挤压微血管使管腔狭窄呈裂隙样、甚至闭塞,血管内皮细胞肿胀。同时可见大部分神经元形态结构正常,仅见个别神经元有变性改变,如轻度的核膜凹陷、核内染色质浓集等(图 2)。光镜下亦可见星形细胞肿胀,核染色浅淡呈空泡样,血管周围间隙增宽,神经元形态结构正常(图 3)。6 h 实验组左侧尾状核、24 h 组及对照组尾状核组织结构、细胞形态基本正常。

讨 论

谷氨酸是基底节的主要兴奋性递质,存在于基底节的主要传入系统和基底节内各核团间的循环通路上。谷氨酸受体分为离子型和代谢型两种。tACPD 是一种选择性的代谢型谷氨酸受体的激活物,通过细胞膜上 G 蛋白引起细胞内信使系统变化,与磷酸肌醇的水解和细胞内钙离子的释放有关^[2-5]。本实验结果表明大鼠尾状核内注射 tACPD 可引起大鼠向对侧旋

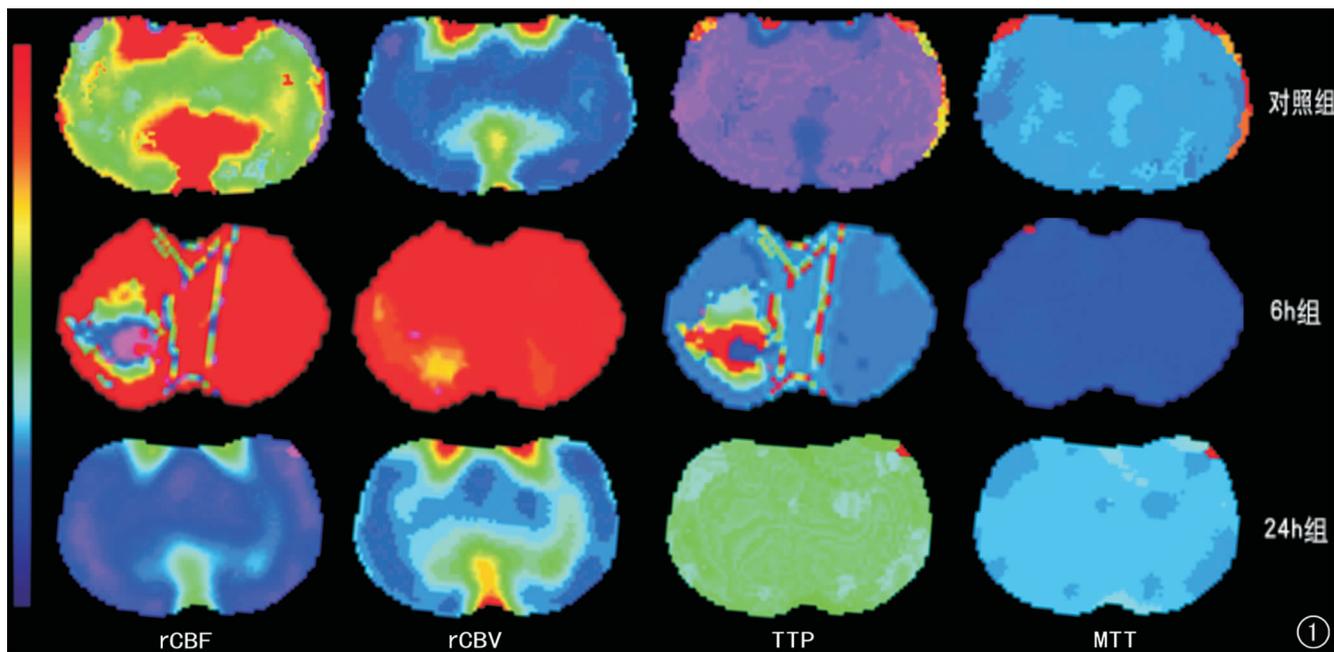


图1 三组动物CT灌注图像。示注射tACPD后6h组右侧尾状核区rCBF及rCBV较对侧降低,MTT延长,提示局部脑血流量降低。24h组及对照组各灌注图未见明显异常。

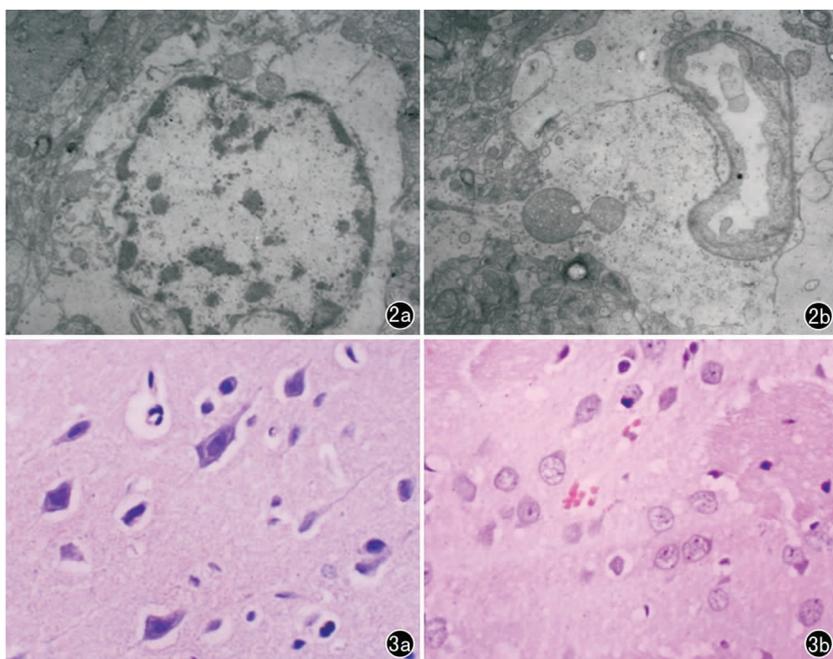


图2 实验组右侧尾状核(电镜6300倍)。a)示肿胀星形细胞,核膜凹陷,核内异染色质较多,胞浆内细胞器稀疏;b)示星形细胞足突肿胀,血管腔受压狭窄。

图3 实验组右侧尾状核(光镜HE×40)。a)示神经元结构形态基本正常,血管周围间隙增宽,呈空泡样改变;b)示多个肿胀的星形细胞,染色较淡,胞浆组织疏松。

转,与文献报道一致^[1]。

过去通常认为由于星形细胞有独特的能量储备,对缺氧的敏感性不及神经元,所以星形细胞的改变落

后于神经元,且以增生为主,表现为体积增大、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)染色呈强阳性。然而越来越多的实验表明,脑损伤后极早期就可出现星形细胞肿胀、变性甚至崩解坏死等改变^[6,7]。而星形细胞肿胀后终板压迫微血管,使管腔狭窄、甚至闭塞,影响局部血液循环,并且星形细胞还可以释放谷氨酸等毒性介质,更加重了脑局部缺血,从而引起恶性循环。星形胶质细胞之间具有广泛的缝隙连接,它也是离子、特别是 K^+ 的连通转运通道,使神经细胞活动兴奋时向细胞外释放的 K^+ 能够经过星形胶质细胞网络疏散、缓冲。有研究认为,缺血区附近的星形胶质细胞可以根据需要调整缝隙连接状态,表现为其免疫特性、超微结构、磷酸化状态的改变^[8]等。内皮细胞基底膜外70%以上的面积由I型星形胶质细胞的血管终足构成。血脑屏障可能是脑微血管内皮细胞—胶质细胞—神经细胞之间的动态功能和(或)结构的网络关系,脑微血管内皮细胞需经星形胶质

细胞的诱导才能形成血脑屏障的关键性结构——内皮细胞的紧密连接。同时,近年的研究还发现,星形胶质细胞可调控神经元的生存及突触功能活动^[9]、决定神

神经元突触的数量、提高突触间信息传递的效率^[10]。因此,脑缺血时星形胶质细胞对神经元的存活与功能具有重要作用。

CT 灌注成像是通过观察静脉内团注对比剂后脑组织密度随时间的变化,根据不同的数学模型计算得到局部脑血容积(rCBV)、局部脑血流量(rCBF)、平均通过时间(MTT)及最大峰值时间(TTP)。根据中心容积定理^[11,12],其关系为: $rCBV = rCBF \times MTT$ 。在注药后 6 h 实验组中,rCBF 和 rCBV 对脑血流量下降最为敏感,可清楚看到注射点周围血流量较对侧明显下降,且半定量计量差异有显著性意义。部分实验动物亦可显示 MTT 延长及 TTP 滞后。部分动物 TTP、MTT 未见明显异常改变,可能因为动物体积较小,血液循环相对较快,因此从注射对比剂到达到峰值时间间隔较短,对与时间相关的 TTP 和 MTT 计算影响较大。在以往脑局部缺血的影像学临床研究中,rCBV 均表现为升高。原因为脑局部缺血早期,远端血管代偿性扩张,使局部脑血容积保持恒定,以保证正常脑功能。而在本实验中,6 h 组电镜及光镜均提示星形细胞肿胀导致微血管受压狭窄,而并不是象文献所讲代偿扩张,因此 rCBV 比值下降时则提示脑局部微循环发生障碍^[13]。

Yuan 等^[2]研究发现,大鼠脑尾状核注射 tACPD 6 h 后脑组织肿胀最明显,随时间推移脑组织肿胀逐渐消失,到 24 h 基本恢复正常。本研究中,24 h 组大鼠旋转运动、脑水含量、CT 灌注均恢复正常。病理检查发现星形细胞形态恢复正常,足板肿胀消失,未见明显微血管受压改变。同时 CT 灌注检查大脑 rCBF、rCBV 图均未见明显异常,说明脑局部血流量基本恢复正常。因此,星形细胞肿胀的恢复,解除了对微血管的压迫,可以使局部脑血流量恢复正常。高培毅等^[10]通过建立大鼠脑局部低灌注模型发现,脑血流量降低时,电镜及光镜下都可以发现星形细胞肿胀,本研究从反面论证如果星形细胞肿胀恢复,血流量可恢复正常。因此,脑缺血时如果及时恢复脑血流,控制星形细胞肿胀,可最大程度地恢复脑神经细胞功能。

本研究通过星形细胞肿胀模型的建立及病理、影像分析,证实了星形细胞肿胀可以引起脑局部微循环障碍,从而使血流量下降。而星形细胞肿胀恢复后,局部脑血流亦可随之恢复正常。因为脑损伤所致脑水肿

以星形细胞肿胀为主,因此早期治疗、控制和缓解星形细胞肿胀,对恢复脑功能有重要的作用。CT 灌注成像可以清楚地显示由于星形细胞肿胀造成的局部脑血流动力学变化。

参考文献:

- [1] Sacaan AI, Monn JA, Schoepp DD. Intrastriatal Injection of a Selective Metabotropic Excitatory Amino Acid Receptor Agonist Induces Contralateral Turning in the Rat[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991, 259(3): 1366-1370.
- [2] Yuan F, Wang TY, Luo L, et al. Development of Cytotoxic Cerebral Edema in Rats Following Intracaudatum Injection of tACPD, an Agonist of Metabotropic Glutamate Receptors[J]. *Chin Med J*, 2000, 113(8): 728-732.
- [3] Menzies SA, Betz AL, Hoff JT. Contributions of Ions and Albumin to the Formation and Resolution of Ischemic Brain Edema[J]. *J Neurosurg*, 1993, 78(2): 257-266.
- [4] Verma A, Moghaddam B. Regulation of Striatal Dopamine Release by Metabotropic Glutamate Receptors[J]. *Synapse*, 1998, 28(3): 220-226.
- [5] Pin JP, Colle CD, Bessis A, et al. New Perspectives of the Development of Selective Metabotropic Glutamate Lignad[J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 375(1-3): 277-294.
- [6] Kimelberg HK. Current Concepts of Brain Edema: Review of Laboratory Investigations[J]. *J Neurosurg*, 1995, 83(6): 1051-1059.
- [7] Yang GY, Betz AL, Chenevert T, et al. Experimental Intracerebral Hemorrhage: Relationship Between Brain Edema, Blood Flow, and Blood-Brain Barrier Permeability in Rats[J]. *J Neurosurg*, 1994, 81(1): 93-102.
- [8] Cotrina ML, Kang J, Lin JH, et al. Astrocytic Gap Junctions Remain Open During Ischemic Conditions[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(7): 2520-2537.
- [9] Dietrich WD, Danton G, Hopkins AC, et al. Thromboembolic Events Predispose the Brain to Widespread Cerebral Infarction After Delayed Transient Global Ischemia in Rats[J]. *Stroke*, 1999, 30(4): 855-861.
- [10] Ullian EM, Sapperstein SK, Chirstopherson KS, et al. Control of Synapse Number by glia[J]. *Science*, 2001, 291(5504): 657-661.
- [11] 高培毅, 林燕. 微机辅助 CT 脑灌注成像以及定量测量[J]. *中华放射学杂志*, 2002, 36(1): 7-10.
- [12] Klotz E, Konig M. Perfusion Measurement of the Brain: Using Dynamic CT for the Quantitative Assessment of Cerebral Ischemia in Acute Stroke[J]. *Eur J Radiology*, 1999, 30(3): 170-184.
- [13] 高培毅, 梁晨阳, 林燕, 等. 脑梗死前期脑局部微循环障碍动态 CT 灌注成像的实验研究[J]. *中华放射学杂志*, 2003, 37(8): 887-891.

(收稿日期: 2004-04-22)