

• 实验研究 •

急性脑缺血时缺血对侧血流动力学动态变化的实验研究

陈唯唯, 漆剑频, 吴静, 黄文华, 宋金梅

【摘要】 目的:研究急性脑缺血时缺血对侧脑组织的血流动力学变化。**方法:**采用 1:1 配对方法, 实验组 6 只兔成功制作急性局灶性脑缺血模型, 对照组 6 只行假手术。采用 GE Lightspeed 16 MSCT, 在基础灌注后于栓塞后不同时间点进行 CT 灌注。在完成缺血 12h CT 灌注扫描后, 断头取脑, 进行 TTC 染色和 Bcl-2 免疫组织化学染色。测量不同时间点缺血对侧相同区域灰质和白质区参数值并与对照组相同区域比较; 实验组两侧大脑半球免疫组化切片进行 Bcl-2 阳性细胞计数, 并与对照组比较。**结果:**TTC 染色示实验组缺血侧脑组织出现白色的梗死区, 缺血对侧和对照组的两侧大脑半球均未见梗死区。实验组缺血侧、缺血对侧、对照组的 Bcl-2 阳性表达细胞数分别为 25 ± 2 个/HP、 13 ± 4 个/HP 和 1 ± 1 个/HP ($\bar{x} \pm s$), 两两间差异均有显著统计学意义 ($P < 0.001$)。实验组缺血对侧 CBV 在缺血 1 h 内呈轻度上升趋势, 1 h 后下降, 处于一个低水平, 8 h 后又轻度上升; CBF 在缺血 12 h 内呈逐渐下降趋势。实验组的缺血对侧 CBV 或 CBF 在脑缺血 12 h 内的动态变化与对照组有显著性差异 ($P < 0.001$), 缺血对侧灰白质之间的动态变化亦有显著差异 ($P < 0.001$)。**结论:**急性脑缺血时缺血对侧脑组织的血流呈可逆性下降, 且引起受累脑细胞凋亡。

【关键词】 体层摄影术, X 线计算机; 脑缺血; 动物实验

【中图分类号】 R814.42 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2006)11-1099-04

Experimental Study on the Hemodynamic Changes of the Counterpart of the Cerebral Ischemic Lesion in Acute Cerebral Ischemia CHEN Wei-wei, QI Jian-pin, WU Jing, et al. Department of Radiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, P. R. China

【Abstract】 Objective: To investigate the hemodynamic changes of the counterpart of the ischemic brain in acute cerebral ischemia. **Methods:** In our experiment, focal cerebral ischemia models were successfully established in 6 rabbits (designated as experimental group), a sham operation was undergone in 6 other rabbits (designated as control group). All of the CT scans were performed with a GE Lightspeed 16 multisliced CT scanner. Following the baseline scans, further CT perfusion scans were performed at the same sites of the brain every hour till 12 hours since the ischemic process induced by embolus delivery. Then, the heads of the rabbits were cut down and the brains were taken off for study. The brains were stained with TTC and studied the expression of Bcl-2 protein with immunohistochemical technique. CT perfusion parameters of the gray and white matter of the counterparts of the ischemic lesions at different time-points were measured and compared with those relative data obtained from the control rabbits. The Bcl-2 positive cells were counted. **Results:** On the TTC maps, except the ischemic side of brain of the experimental group, no white areas were found in their counterparts and the brains of the control group. The counts of Bcl-2 positive cells of the ischemic brain parenchyma, those of their counterparts and of the control group were 25 ± 2 /HP, 13 ± 4 /HP and 1 ± 1 /HP ($\bar{x} \pm s$) respectively. Marked statistic difference was found among them ($P < 0.001$). In comparison with those of the control group, both CBV and CBF were lower in the counterparts of the experimental group. In the experimental group, there was an initial and mild increase of CBV of the counterparts, then a decrease was found and finally a mild increase happened again. CBF of the counterparts decreased gradually within 12 hours since ischemia. Distinguished statistic differences in both CBV and CBF were found between counterparts of the experimental and control groups. The hemodynamic changes of gray matter were not the same as those of the white matter ($P < 0.001$). **Conclusion:** CBV and CBF of counterparts of the ischemic hemispheres reversibly decreased at acute phase, however, some of the involved brain cells would have been led to apoptosis.

【Key words】 Tomography, X-ray computed; Brain ischemia; Animal experimentation

临床上应用 CT 灌注成像 (CT perfusion, CTP) 对急性脑缺血进行诊断时, 是以缺血对侧脑组织作为内

参照的, 也就是假设缺血对侧脑组织血流动力学是相对恒定的, 因此缺血对侧的血流动力学是否变化直接关系到诊断的准确性, 是一个很值得探讨的问题。本实验采用 1:1 配对的实验设计以消除多次注射对比剂的影响, 旨在研究缺血对侧脑组织的血流动力学是

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院放射科

作者简介: 陈唯唯 (1977—), 女, 湖北沙市人, 博士, 医师, 主要从事中枢神经系统影像学诊断。

否变化及如何变化的问题。

材料与方 法

1. 兔急性局灶性脑缺血模型的制作

新西兰大白兔(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)12只,雄性,实验组和对照组各6只(2.3~2.5 kg),按1:1配对。实验组兔经麻醉后穿刺一侧颈外动脉,将一导管由颈外动脉插入颈内动脉,并通过导管导入一10 mm长悬于2 ml生理盐水中的自体血栓^[1]。穿刺一侧股静脉用于对比剂团注。对照组行假手术,除不打入自体血栓外,其它手术过程同实验组。

2. CT灌注成像方法

造模前行CT灌注扫描一次,作为基础对照。于自体血栓栓塞或假手术后2 min扫描一次,1~6 h内每隔1 h扫描一次,6~12 h内每隔2 h扫描一次,每一只兔子共进行11次CT灌注扫描。所有扫描均在GE Lightspeed 16 MSCT上完成。扫描参数为:80 kV,100 mA,512×512矩阵,视野9.6 cm,层厚2.5 mm。每次扫描先作平扫定位,然后在团注对比剂(总量1 ml/kg,流率1 ml/s)的同时进行同层连续扫描30 s。一次扫描可获得4层CT灌注图像。

3. TTC染色和Bcl-2免疫组织化学染色

在完成缺血12 h CT灌注扫描后,断头取脑,并根据CT灌注扫描层面以2.5 mm的层厚切片,然后第一、三层在37℃,1%2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)中孵育30 min,第二、四层行Bcl-2免疫组织化学染色,Bcl-2多克隆抗体购于北京中山生物试剂有限公司,具体操作方法参照细胞凋亡检测试剂盒说明书。

4. 图像分析

在工作站上应用CT灌注软件算出每个时间点的脑血容量图(cerebral blood volume, CBV)和脑血流量图(cerebral blood flow, CBF)。首先在基础扫描的参数图上于缺血对侧选择40个ROI(每一层选择10个ROI,其中灰质和白质各5个,4层共40个ROI),记录每个ROI的CBV、CBF值及坐标值,在其它时间点的参数图上根据坐标勾出相同的ROI。1:1配对的两只兔子间在选择ROI时根据坐标值尽可能选择一致部位。由两位不知CTP结果的医师分别对TTC染色结果进行分析,评价缺血对侧是否存在白色梗死区。在每张切片(包括实验组和对照组)的缺血对侧随机选择10个高倍镜视野(×40)进行Bcl-2阳性细胞计数。

5. 统计学方法

本实验结果采用SAS 8.1统计软件包进行统计。应用描述性统计分析求出实验组和对照组各个时间点的均数及标准差。对实验组和对照组的组间差异、缺血对侧脑组织灰白质间的差异以及各个时间点间的差异性采用多元方差分析(MANOVA)方法,对各参数随时间的动态变化采用应用于多变量重复测量的方差分析及球形检验。实验组两侧大脑半球与对照组Bcl-2阳性表达的差异性采用两个独立样本的 t 检验。检验水准为 $P<0.05$ 。

结 果

实验组6只兔子均成功造模,TTC染色示实验组缺血侧脑组织出现白色梗死区,缺血对侧和对照组的两侧大脑半球均未见梗死区(图1)。Bcl-2免疫组织化学染色阳性细胞胞浆呈棕黄色,弥漫染色,实验组缺血侧可见明显Bcl-2阳性表达,缺血对侧亦可见Bcl-2阳性表达,以缺血镜像区最为明显,对照组的两侧大脑半球仅有少量Bcl-2阳性表达。实验组缺血侧、缺血对侧、对照组的Bcl-2阳性表达细胞数分别为 25 ± 2 个/HP、 13 ± 4 个/HP和 1 ± 1 个/HP($\bar{x}\pm s$),实验组两侧大脑半球Bcl-2阳性表达与对照组有显著统计学差异($P<0.001$),实验组两侧大脑半球之间Bcl-2阳性表达亦有显著统计学差异($P<0.001$)(图2)。

在CT灌注参数图上每只兔子选择40个ROI(灰质和白质各20个),12只兔子,共480个ROI进行统计学分析。实验组和对照组缺血对侧不同时间点的动态变化见图3,实验组缺血对侧灰白质的CBV、CBF均数值见图4。统计结果显示实验组缺血对侧的CBV、CBF值均低于对照组,提示实验组缺血对侧血流下降。对照组CBV及CBF在12 h内的动态变化呈锯齿形表现,而实验组的缺血对侧不呈锯齿形表现,CBV在缺血1 h内呈轻度上升趋势,1 h后下降,处于一个低水平,8 h后又轻度上升,CBF在缺血12 h内呈逐渐下降趋势。实验组缺血对侧和对照组在脑缺血12 h内CBV和CBF的动态变化差异均有显著性意义($P<0.001$),缺血对侧灰白质之间的动态变化亦有显著差异($P<0.001$)。

讨 论

本实验通过设立1:1配对来消除脑缺血以外的其它因素的影响,诸如多次对比剂注射,手术应激,长时间处于麻醉状态等,使研究局灶性脑缺血时缺血对侧的血流动力学改变成为可能。从图4可以看出:对照组CBV及CBF在12 h内的动态变化呈锯齿形表

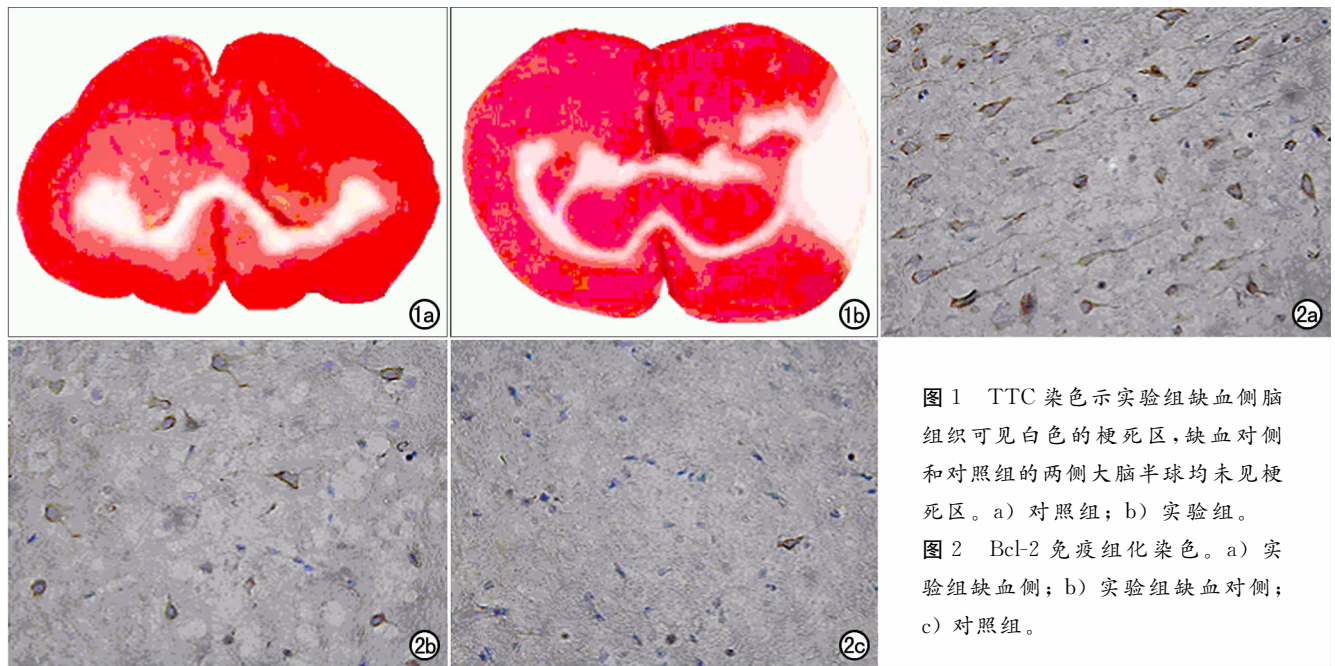


图 1 TTC 染色示实验组缺血侧脑组织可见白色的梗死区,缺血对侧和对照组的两侧大脑半球均未见梗死区。a) 对照组; b) 实验组。

图 2 Bcl-2 免疫组化染色。a) 实验组缺血侧; b) 实验组缺血对侧; c) 对照组。

现,比较符合多次等间隔时间等量给药的药代动力学^[2]。实验组缺血对侧的 CBV 和 CBF 值均明显低于

对照组,且无论 CBV 或 CBF 实验组的缺血对侧与对照组在脑缺血 12 h 内的动态变化均有显著性差异

($P < 0.001$),缺血对侧灰白质之间的动态变化亦有显著差异($P < 0.001$),用统计学方法证实了脑缺血时缺血对侧脑组织血流动力学发生变化,表现为血流下降,且灰白质的血流下降程度亦不同。TTC 染色示缺血对侧无白色梗死区,说明缺血对侧的血流下降不引起脑组织梗死。

国内外也有学者在应用 PET、SPECT、XeCT 等研究脑缺血的临床和动物实验中观察到缺血对侧脑血流下降的现象,并且多数认为与神经功能联系不能(diaschisis)有关^[5-7]。

“神经功能联系不能”一词由 Von Monakow^[5] 在 1914 年首次提出,至 1958 年首次由 Kempinsky^[6] 通过动物实验证实。其含义有四点:①一个脑区的损

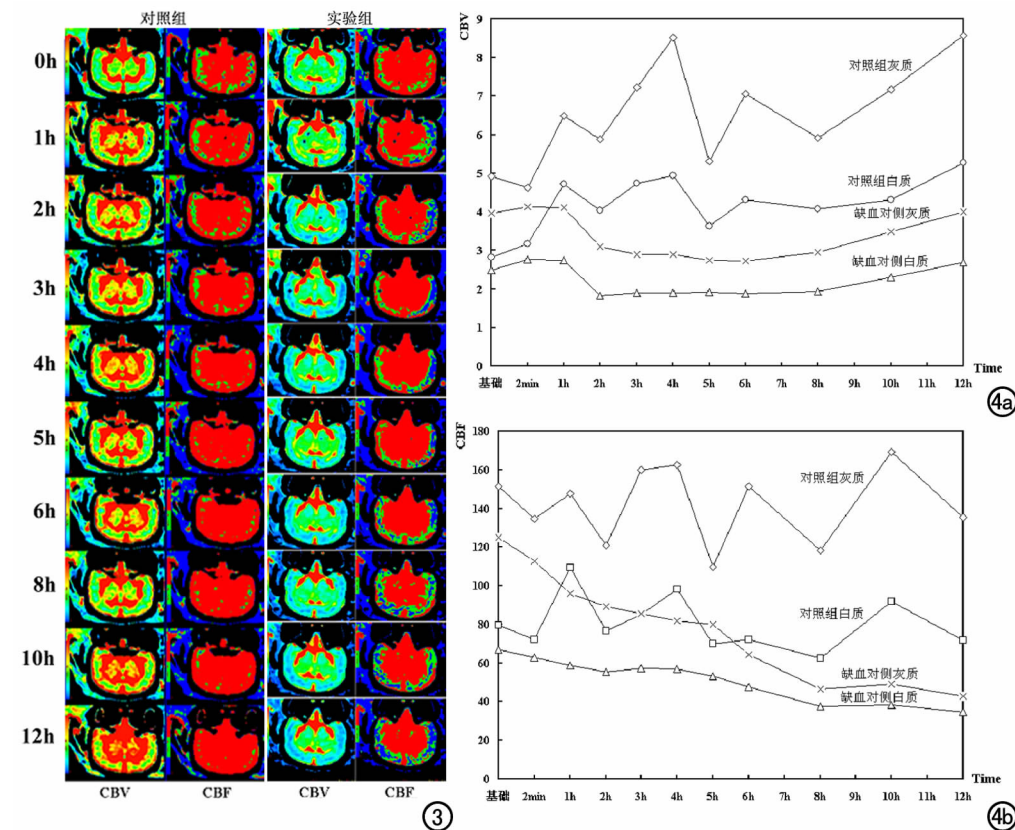


图 3 造模前后不同时间点的 CBV 和 CBF 图。图 4 a) 造模前后对照组和实验组缺血对侧灰白质的 CBV 动态变化; b) 造模前后对照组和实验组缺血对侧灰白质的 CBF 动态变化。对照组 CBV、CBF 在缺血 12 h 内的动态变化呈锯齿形表现,而实验组的缺血对侧 CBV 在缺血 1 h 内呈轻度上升趋势,1 h 后下降,8 h 后又轻度上升,CBF 在缺血 12 h 内呈逐渐下降趋势。缺血对侧灰质 CBF 下降幅度较白质大。

害能引起邻近区域或与之相联系的远距离区域功能丧失;②机制为对远距离区域的兴奋性刺激丧失;③可恢复性;④受损区域在神经解剖通路上。Kempinsky^[6]将其归纳为同侧效应、对侧效应和交叉性小脑失联络三类。对侧大脑神经功能联系不能的机制多认为是皮质的冲动不能经胼胝体到达对侧所致。Rubin 等^[7]应用 XeCT 对急性缺血性卒中的脑血流进行研究,发现 23 例幕上患者中 35% 有对侧大脑半球的血流降低。Reinecke 等^[8]在对大鼠 MCAO 模型的电生理研究也发现存在经胼胝体的电生理神经功能联系不能现象。Von Monakow 和 Kempinsky 均认为神经功能联系不能是可逆的,文献报道神经功能联系不能的发生和恢复情况因人而异^[9,10]。我们的实验结果中 CBV 在缺血 1 h 内呈轻度上升趋势,1 h 后下降,处于一个低水平,8 h 后又轻度上升,这一动态变化也说明缺血对侧脑血流变化有一定的时间性和可逆性。

另外,也有学者认为缺血对侧脑血流下降与脑侧支循环和盗血现象有关。一侧颈动脉及其分支狭窄或阻塞后,健侧血流通过前后交通动脉和软脑膜吻合支进行代偿,致使健侧脑血流下降^[11]。

那么,缺血对侧脑血流下降是否为自体血栓断裂小栓子阻塞血管所致呢?在局灶性脑缺血后 willis 环的作用是代偿供血,起到第一级侧支循环的作用^[12],血流方向是从对侧和缺血侧其它部位流向缺血区,即使血栓在脑内断裂,小栓子顺血流至末梢分支的可能性较逆血流至对侧的可能性大得多,因此,自体血栓断裂经 Willis 环至对侧造成阻塞的可能性较小。

本实验 Bcl-2 免疫组化染色结果显示:缺血对侧可见 Bcl-2 阳性表达,以缺血镜像区最为明显,与对照组有显著统计学差异,但 TTC 染色显示缺血对侧未见梗死区,说明缺血对侧的血流下降不导致脑组织梗死,但可引起脑细胞凋亡。Joashi^[3]和 Crowe^[4]的实验结果也发现了缺血远隔部位的细胞凋亡现象,并认为缺血远隔部位细胞凋亡的出现可能与多聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)的大量裂解有关。

脑缺血急性期缺血对侧血流下降和神经元凋亡的现象可以解释许多临床症状和神经定位体征。如一些腔隙性脑梗死患者,症状和体征本应是局限的,但临床上却可见由头痛、头晕、困倦乏力、打哈欠、嗜睡、反应迟钝、表情呆滞等全脑症状,这可能与广泛脑缺血及脑功能抑制有关。不少脑卒中的患者,在急性期神经系统检查时,CT 所示病灶虽为一侧,但却有两侧锥体束

征,这可能是由缺血镜像区或对侧弥漫性神经功能联系不能引起。

目前临床上多以缺血对侧作为内参照进行急性脑缺血的诊断和半暗带的判定,是假定缺血对侧的血流动力学是稳定的。但是,本实验证实缺血对侧在急性脑梗死的早期即有血流动力学变化,那么以缺血对侧作为参照势必会造成系统性的偏差。因此,还需进一步深入研究消除这种系统偏倚的方法,使我们的诊断更为准确。

参考文献:

- [1] Benes V, Zabramski JM, Boston M, et al. Effect of Intra-arterial Tissue Plasminogen Activator and Urokinase on Autologous Arterial Emboli in the Cerebral Circulation of Rabbits[J]. Stroke, 1990, 21(11):1594-1599.
- [2] 刘昌孝. 实用药物动力学[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2003. 134-135.
- [3] Joashi UC, Greenwood K, Taylor DL, et al. Poly (ADP ribose) Polymerase Cleavage Precedes Neuronal Death in the Hippocampus and Cerebellum Following Injury to the Developing Rat Forebrain[J]. Eur J Neurosci, 1999, 11(1):91-100.
- [4] Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, et al. Apoptosis and Delayed Degeneration after Spinal Cord Injury in Rats and Monkeys [J]. Nat Med, 1997, 3(1):73-76.
- [5] Von Monakow C. Diaschisis (1914 Article Translated by G Harris), in Pribram KH (ed). Brain and Behavior I: Moods, States and Mind[M]. Baltimore Penguin, 1969. 27-36.
- [6] Kempinsky WH. Experimental Study of Distant Effects of Acute Focal Brain Injury, a Study of Diaschisis[J]. AMA Arch Neurol Psychiatry, 1958, 79(4):376-389.
- [7] Rubin G, Levy EI, Scarrow AM, et al. Remote Effects of Acute Ischemic Stroke; a Xenon CT Cerebral Blood Flow Study[J]. Cerebrovasc Dis, 2000, 10(3):221-228.
- [8] Reinecke S, Lutzenburg M, Hagemann G, et al. Electrophysiological Transcortical Diaschisis after Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) in Rats[J]. Neurosci Lett, 1999, 261(1-2):85-88.
- [9] Juhasz C, Kamondi A, Szirmai I. Spectral EEG Analysis Following Hemispheric Stroke: Evidences of Transhemispheric Diaschisis [J]. Acta Neurol Scand, 1997, 96(6):397-400.
- [10] Komatsumoto S, Greenberg JH, Hickey WF, et al. Clinicopathological Observations in Middle Cerebral Artery Occlusion in the Cat[J]. Neurol Res, 1995, 17(2):120-128.
- [11] 赵云辉, 马著彬, 高新疆, 等. 颈内动脉狭窄或闭塞后侧支循环与脑缺血的关系研究[J]. 临床放射学杂志, 2004, 23(7):553-557.
- [12] David SL. Collateral Circulation[J]. Stroke, 2003, 34(9):2279-2284.

(收稿日期:2006-03-28 修回日期:2006-06-27)