

## 川芎嗪对大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛病理变化的影响

何承彪<sup>1</sup>, 姜冰<sup>2</sup>

1. 长沙市第四医院神经外科 410006

2. 中南大学湘雅医院神经外科 410008

**摘要:**目的 探讨川芎嗪对大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后 CVS 病理变化的影响。方法 健康成年 SD 大鼠 60 只随机分为四组( $n=15$ )。①A 为 NS 组;枕大池两次穿刺注入生理盐水 ②B 为 SAH + NS 组 ③C 为 SAH + Nimotop 组 ④D 为 SAH + TMP 组。B、C、D 三组均在枕大池两次注入自体动脉血制作成 SAH 模型后,自当天开始分别经腹腔注人生理盐水 2 ml,或尼莫同 0.1 mg,或川芎嗪 20 mg,每日一次直到动物处死。各组动物分别在第 1、4、7 天分三批处死,每批 5 只。结果 A 组动物基底动脉组织结构正常。B 组动物基底动脉在第 1 天时出现血管痉挛,第 4 天时出现血管壁增厚,均以第 7 天时最为显著。C 组动物血管痉挛程度有不同程度缓解,但第 4 天亦出现血管壁增厚,在第 7 天明显。D 组动物血管痉挛及血管壁增厚明显缓解,血管壁 NF- $\kappa$ Bp65, Cox2 的表达与同时段 B 组和 C 组比较明显减弱( $P<0.05$ )。结论 川芎嗪对 SAH 脑血管痉挛具有一定的预防作用。

**关键词:**蛛网膜下腔出血;脑血管痉挛;川芎嗪

## The effect of tetram ethylozazine on the pathological changes of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in Rats

HE Cheng-Biao<sup>1</sup>, JIANG Bing<sup>2</sup>, 1. Department of Neurosurgery, The Fourth Hospital of Changsha, Changsha 410006, China 2. Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital of Central-South University, Changsha 410008, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of tetram ethylozazine (TMP) on the pathological changes of cerebral vasospasm (CVS) after subarachnoid hemorrhage(SAH) in rats. **Methods** 60 healthy adult SD rats were randomly divided into four groups ( $n=15$ ). In group A: normal Saline was injected in the cisterna magna; in group B, C, D: autologous arterial was injected in the cisterna magna, and added NS 2ml or nimotop 0.1mg or TMP hydrochloride 20mg intraperitoneal injection every day. Five animals in each group were sacrificed and the brain samples were harvested at day 1, day 4 and day 7 respectively. **Results** The structure of basilar artery(BA) was normal in group A. The vasospasm of BA was found in group B at day 1 and day 4, especially at day 7. The vasospasm in group C was remarkably remitted compared with that in SAH group at the same period. The vasospasm and vascular wall thickening and expression of NF- $\kappa$ Bp65 and Cox2 in group D was remarkably remitted compared with that in group B and C. **Conclusions** TMP may have the potential ability to prevent CVS after SAH.

**Key words:** subarachnoid hemorrhage; cerebral vasospasm; TMP

脑血管痉挛 cerebral vasospasm (CVS) 是 SAH 最严重的并发症之一,也是 SAH 病人致残和死亡的重要原因,常引起脑组织严重急性缺血或迟发性缺血性损害,甚至导致脑梗死<sup>[1]</sup>。CVS 分为两种:一是 SAH 后血液对脑血管的机械性化学性刺激所致的暂时性或早发性 CVS;二是持续时间较长的、目前机制尚未明了的持续性 CVS 或称为迟发型脑

血管痉挛(delayed cerebral vasospasm, DCVS)。DCVS 不同于急性期 CVS,病理解剖学上可观察到痉挛血管平滑肌细胞的坏死和内皮细胞的剥离<sup>[2]</sup>,DCVS 一旦发生,则难以逆转<sup>[3]</sup>,是 SAH 患者致残和致死的重要原因。SAH 后脑动脉壁继发出以炎症为主的病理改变,更加重了脑血管痉挛和脑缺血<sup>[4]</sup>,形成恶性循环。研究表明免疫炎症反应在

收稿日期:2010-09-29 修回日期:

作者简介:何承彪(1968-),男,硕士,主治医师,主要研究方向:脑血管病变,颅脑外伤。

CVS 的发生和发展中发挥了重要作用<sup>[5]</sup>。

川芎嗪<sup>[6]</sup> 化学名为 2,3,5,6-四甲基吡嗪,简称四甲基吡嗪 (TMP),是我国传统具有活血化瘀,理气,疏风止痛作用的中草药—川芎的一种生物碱,已经进行了川芎嗪在动物脑缺血方面的实验研究<sup>[7-9]</sup>,并发表了关于 TMP 对 SAH 后 CVS 影响的实验报道<sup>[9]</sup>。且在临床中广泛应用于治疗缺血性脑病<sup>[10]</sup>,本实验旨在通过建立 SAH 模型研究 TMP 对 SAH 后急、慢性 CVS 的影响。为治疗 CVS 提供新的思路。

1 实验动物选择与分组

健康成年雄性 SD 大鼠 60 只(由中南大学湘雅医学院动物学部提供),体重 200 ± 20 克,随机分为 A、B、C、D 4 组: A 为生理盐水组:经枕大池两次注入生理盐水制成对照组; B 为 SAH + NS 组:经枕大池两次注入自体动脉血制成 SAH 模型后,自当天开始经腹腔注入生理盐水 2 ml,每日一次直到动物处死; C 为 SAH + 尼莫同 (Nimotop) 组:对 SAH 模型自当天开始经腹腔注入尼莫同 0.1 mg,每日一次直到动物处死; D 为 SAH + 川芎嗪 (TMP) 组:对 SAH 模型自当天开始经腹腔注入川芎嗪 20 mg,每日一次直到动物处死。各组分别在第 1、4、7 天分三批处死,每批 5 只。

2 实验方法

2.1 SD 大鼠生理盐水对照组模型的制备

取健康 SD 大鼠,以 0.3% 的戊巴比妥 0.25 ml 腹腔内注射麻醉,枕部及一侧腹股沟手术区备皮常规消毒,于枕骨至颈 2 棘突间切开皮肤,沿枕骨向后下钝性分离白线下两侧肌肉至环椎后弓,显露环枕筋膜,以环椎后弓中点向一侧外耳道方向小心斜行刺入寰枕筋膜约 1 mm,缓慢抽出 0.2 ml 脑脊液后再注入生理盐水约 0.2 ml 制作 NS 对照组。

2.2 SD 大鼠枕大池两次注血 DCVS 模型的制备

实验方法同上,至抽出 0.2 ml 脑脊液后,分离股动脉后用 1 ml 注射器 (不加抗凝剂) 抽取自体股动脉血约 0.2 ml,缓慢注入枕大池内。术后置头低脚高位 30 min。48 小时后,重复上述操作完成枕大池第二次注血。

2.3 生理盐水,尼莫同及川芎嗪的应用

SAH 动物模型建立后,每天一次从腹腔内注入生理盐水 2 ml 制成 B 组;注入尼莫同 0.1 mg 制成 C 组;注入川芎嗪 20 mg 制成 D 组。

2.4 动物的处死方法及标本留取

用上述麻醉方法麻醉动物后,用 4% 多聚甲醛 PBS 溶液经灌注固定后,开颅取含有基底动脉全长的脑干。将标本再置于 4% 多聚甲醛溶液固定,备组织学检查及管径的观测。

2.5 常规 HE 染色的光镜观察

经 4% 多聚甲醛固定后,石蜡包埋,连续横行切片,厚度 5 um,常规 HE 染色。高倍光学显微镜下观察血管壁的内径,管壁厚度及痉挛情况。

2.6 免疫组化检测 NF-κBp65、Cox2

严格按照免疫组化试剂说明书要求进行操作。显微镜下观察 NF-κBp65 的表达,免疫反应阳性细胞主要在血管内皮细胞和平滑肌细胞的胞浆或/和胞核内表达。Cox2 免疫反应阳性细胞主要在动脉壁内皮和外膜观察到着色均匀。两者当不用一抗或被同类型的对照抗体替换时,DAB 染色缺乏。再利用自动分析仪记录阳性细胞百分率。

2.7 统计学处理

选择单变量多因素的方差分析。多个样本均数两两之间的比较采用 q 检验。采用统计学软件 SPSS18 进行统计分析,并定义 P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 HE 染色光镜检查

基底动脉壁病理变化如下:见下页

3.2 免疫组化 NF-κBp65、Cox2 的表达

二者免疫组化结果显示: A 组中 NF-κBp65、Cox2 有很微弱的少量表达,组内各时间点比较差别无统计学意义 (P > 0.05)。B、C、D 组均在 SAH 后表达明显,并逐渐上升。见表 1-2。

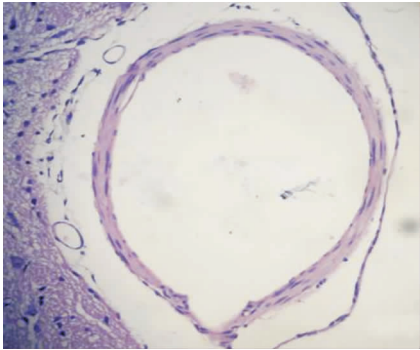
表 1 NF-κBp65 在不同实验组基底动脉血管的表达阳性细胞数 (x ± s)

	第一天	第四天	第七天
A 组	7.40 ± 1.817	6.80 ± 1.789	7.80 ± 1.643
B 组	32.60 ± 3.647	55.40 ± 3.975	78.20 ± 4.147
C 组	31.40 ± 2.702	50.60 ± 4.278	69.80 ± 4.652
D 组	10.40 ± 3.209	12.60 ± 4.506	12.60 ± 3.701

表 2 COX2 在不同实验组基底动脉血管的表达阳性细胞数( $\bar{x} \pm s$ )

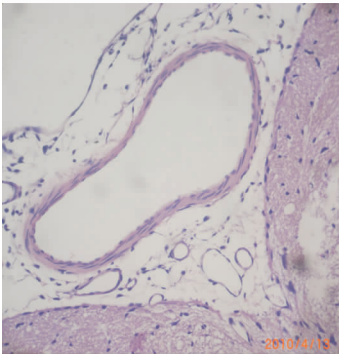
	第一天	第四天	第七天
A 组	4.60 ± 1.517	4.20 ± 1.304	5.4 ± 1.140
B 组	44.00 ± 4.690	58.60 ± 5.941	81.20 ± 4.438
C 组	41.20 ± 3.493	61.20 ± 3.194	81.00 ± 2.646
D 组	12.60 ± 3.647	14.00 ± 2.739	17.40 ± 3.362

在上表 1-2 中:B 组与 C 组比较无明显差异( $P > 0.05$ )。D 组各时间点阳性细胞数均低于 B、C 组( $P < 0.05$ ),D 组与 B 组和 C 组比较有显著差异( $P < 0.01$ )。B、C、D 组与 A 组比较差别均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

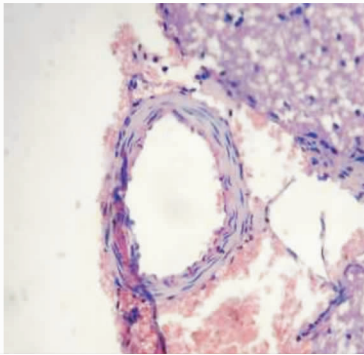


A 组: NS 对照组基底动脉管壁平滑, 组织结构基本正常

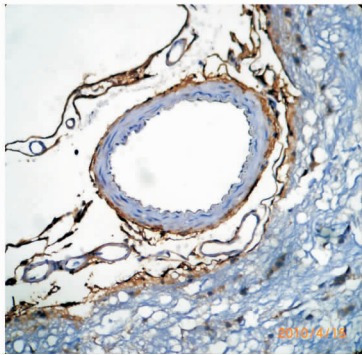
B 组第一天



B 组第四天

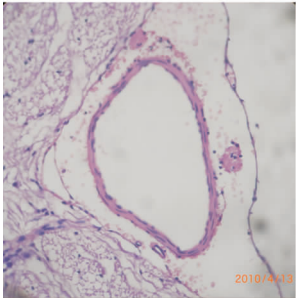


B 组第七天

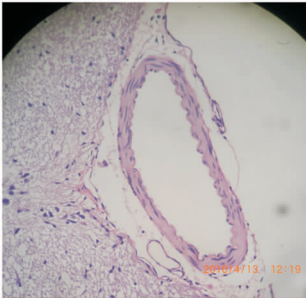


B 组: SAH + NS 组基底动脉从第一天就出现血管痉挛第四天痉挛进一步加重, 同时血管壁明显增厚, 内径显著性变小。第七天时出现内膜迂曲皱褶或断裂, 厚薄不均, 管壁平滑肌层明显增厚, 平滑肌细胞增生、排列紊乱。

C 组第四天



C 组第七天



D 组第七天



C 组: SAH + Nimotop 组术后第一天几乎无脑血管痉挛, 第四天开始血管直径逐渐变小, 血管壁出现增厚。第七天可见血管痉挛不明显, 但内膜亦出现迂曲皱褶或断裂, 厚薄不均, 呈锯齿状, 管壁平滑肌层明显增厚, 平滑肌细胞增生、排列紊乱。

D 组: SAH + TMP 组术后第一天未见基底动脉血管收缩, 第四天血管直径无明显改变, 管壁无明显增厚。第七天见血管壁内膜仍光滑, 无皱褶及锯齿出现, 管径大小无明显改变。

#### 4 讨论

本实验之所以选用大鼠作为实验模型是因为大鼠具有:①脑血管解剖及生理较接近人类;②脑体积较小,易于病理学及生化学观察<sup>[11]</sup>。本实验采用SD大鼠枕大池内注入自体股动脉血法制作SAH动物模型。一般地1次注血主要用于急性CVS观测,两次注血法主要用于DCVS观测。

研究显示DCVS是由多因素和多个环节(如:氧合血红蛋白高分子溶血产物<sup>[12]</sup>,内皮细胞凋亡,血液高凝状态,血管壁细胞增殖,一氧化氮、缩血管物质增多等)共同参与的结果,其发病机制仍不清楚。动物实验和临床研究的结果已经证明应用肾上腺皮质激素药物等抗炎治疗有一定疗效<sup>[13,14]</sup>。因此有学者认为炎症反应引起的血管损伤是DCVS发生的重要原因之一。核因子NF- $\kappa$ Bp65是一个广泛存在于真核细胞内并在机体炎症反应、免疫应答中起重要调节作用的转录因子。多种炎症介质如:TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8。血管内皮细胞粘附分子(VCAM)-1和ICAM-1基因的启动子和增强子中存在一个或多个 $\kappa$ B序列,活化的核因子可单独或与其它转录因子协同参与上述介质基因的诱导表达。核因子的靶基因产物可进一步参与炎症和免疫反应,在机体生理和病理条件下发挥重要作用。环加氧酶(cyclooxygenase, Cox)是参与花生四烯酸的环氧酶代谢途径中的限速酶,可催化花生四烯酸转化为前列腺素(prostaglandins, PG)。Cox2是一种诱导型酶,起“炎症应答”的作用,Cox2在炎症过程中被大量诱导和表达,致炎症反应放大和增强。

在本实验中观察到SAH后血管组织的NF- $\kappa$ B、Cox2表达与血管痉挛程度密切相关,蛋白的表达与血管壁的厚薄呈正向关系。而其在B、C两组表达明显高于D组。因此进一步验证了DCVS可能是SAH脑血管壁及其周围发生过度炎症反应在血管方面的表现<sup>[15]</sup>。可以充分说明在DCVS期免疫炎症反应起了关键性作用。

川芎嗪能有效地抑制SAH后血管壁炎症因子的表达<sup>[16]</sup>,且对SAH后早期和慢性CVS均有预防作用。其可能机理是:川芎嗪预防早期血管痉挛是通过抑制血管平滑肌细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 内流<sup>[17]</sup>,提高钙泵活性增加钙外流,阻断血管平滑肌上的肾上腺 $\beta$ 受体的作用,从而抑制平滑肌的痉挛,其作用机理及疗效表现与尼莫同相同。川芎嗪在慢性CVS期

主要通过减少增多的白细胞和小胶质细胞减轻炎症反应。抑制细胞因子诱导的内皮细胞粘附分子表达的增加和白细胞浸润,抗内皮细胞脂质过氧化损伤,保护、修复血管内皮细胞<sup>[18]</sup>,抑制平滑肌细胞和成纤维细胞增生,从而保护了脑血管壁的完整性;它能清除自由基,使遭到破坏的膜结构得到修复。现认为当SAH发生时,动脉血滞留于血管周围的蛛网膜下腔,使血管发挥正常生理功能的内环境遭到破坏,机体免疫系统为维持内环境稳定,通过炎症反应的方式清除蛛网膜下腔的血液成分。这种炎症反应过程中产生大量调控血管活性因子的物质,造成血管舒缩功能失调,而出现血管痉挛<sup>[19]</sup>,进一步影响脑神经功能。

因此,治疗SAH时的关键是尽快清除蛛网膜下腔的血液及其代谢成份,从根本上清除致炎因子,以减少炎症反应。这也支持了临床上动脉瘤破裂致SAH后,应尽早手术的观点。早手术可以防治再次出血发生,同时术中可清除蛛网膜下腔的积血,防治进一步炎症反应所致的脑血管痉挛所致的继发性损害。针对SAH后早期CVS及晚期DCVS的病理及发病机制,我们认为应采取综合治疗方案:①尽快清除蛛网膜下腔积血:如开颅血肿清除,脑脊液置换等。②早期使用尼莫同:尼莫同是目前公认的对SAH后早期CVS最有效且副作用少的药物,本实验的结果与报道相一致。③待引起SAH的病变血管得以控制(如动脉瘤夹闭或介入栓塞)后,应尽早使用川芎嗪防治DCVS及进行脑保护治疗。在病变血管处理之前不主张使用TMP,是因为其具有活血化瘀,抗血小板聚集,降低血小板黏度的功能,以防其影响凝血功能而发生再出血。④其它综合治疗如:拮抗缩血管物质的药物疗法(NO及其相关药物,ET合成抑制剂和ET受体拮抗剂)和针对炎症反应的治疗措施(抗CD11/CD18单克隆抗体,皮质类固醇,免疫抑制药)。

尽管CVS的发病机制已取得了一定的认识,但在临床治疗方面仍存在诸多问题,始终缺少足够的有效方法来治愈脑血管痉挛。造成这种局面的原因很多,主要是SAH后脑血管痉挛的发病机制复杂,特别是引起迟发性脑血管痉挛病理变化的机理仍未完全阐明,有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Hirashima Y, Endo S, Kato R, et al. Prevention of cerebro-

- vasospasm following subarachnoid hemorrhage in rabbits by the Platelet-activating factor antagonist, E 5880 J Neurosurg, 1996,84(5):826-830.
- [2] Vatter H, Weidauer S, Konczalla J, et al. Time course in the development of cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage; clinical and neuroradiological assessment of the rat double hemorrhage model. Neurosurgery, 2006, 58(6):1190-1197.
- [3] Mayberg MR. Cerebral vasospasm. Neurosurg Clin N Am, 1998,9(3):615-627.
- [4] Tanishima T. Cerebral vasospasm contractile activity of hemoglobin in isolated canine basilar arteries. J Neurosurg, 1980, 53(6):787-793.
- [5] Prunell GF, Svendgaard NA, Alkass K, et al. Inflammation in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage. Neurosurgery, 2005,56:1082-1092.
- [6] 史大卓. 川芎嗪的药物作用刍议. 中国中西医结合杂志, 2003,23(5):377-378.
- [7] 陈洁文, 汤湘江, 万文成. 川芎嗪对大鼠脑急性缺血缺氧损伤的保护作用. 广州中医药大学学报, 1998,3(15):60-63.
- [8] 汪远金, 申国明, 王钦茂. 川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用. 安徽中医学院学报, 2002,2(19):44-45.
- [9] 张跃康, 刘文科, 马潞. 川芎嗪对蛛网膜下腔出血后血浆及脑脊液中内皮素和一氧化氮含量的影响. 四川大学学报(医学版), 2008,39(2):211-213.
- [10] 陈泽涛. 川芎嗪在脑血管病治疗中的应用. 中国中西医结合杂志, 2003,23(5):378.
- [11] 张国瑾, 赵增荣. 国外脑血管疾病研究进展. 北京: 中国医药科技出版社, 2000,4:13-18.
- [12] Zubkov AY, Ogihara K, Tumu P, et al. Bloody cerebrospinal fluid alters contractility of cultured arteries. Neurol Res, 1999,21(6):553-558.
- [13] 刘佰运, 王忠诚, 吴建中, 等. 硫唑嘌呤与甲基强的松龙防治慢性脑血管痉挛的实验研究. 中华医学杂志, 1996,10(76):774-776.
- [14] 刘佰运, 王忠诚, 王硕等. 大剂量激素治疗严重蛛网膜下腔出血的初步报告. 中国急救医学, 2002,2(22):95-96.
- [15] 印红霞, 刘新峰, 史继新. 红细胞生成素治疗兔脑血管痉挛及对核因子  $\kappa$ B 表达的影响. 中国脑血管病杂志, 2008,5(9):408-412.
- [16] 王世龙, 林原, 唐泽耀. 川芎嗪在多类神经系统损伤中的保护作用及其机制研究进展. 中国药理通报, 2010,26(4):438-441.
- [17] 李海强. 中药川芎的现代基础研究及临床应用近况. 现代医药卫生, 2008,24(13):1999-2001.
- [18] 成春真, 孙勇, 文志斌. 川芎嗪抑制凝血酶诱导血管内皮细胞组织因子表达的机制. 中国动脉硬化杂志, 2010,18(3):184-188.
- [19] 张更申, 李聪慧, 孙国柱. CCK-8 对家兔 SAH 后迟发性脑血管痉挛病理变化的影响. 脑与神经疾病杂志, 2006,14(3):172-176.