

组织光学 ·

共聚焦激光扫描显微镜活体观察动脉粥样硬化家兔模型大脑皮质血管内血液缘流厚度的改变*

乡志雄¹, 谢泽宇¹, 庄明华¹, 唐永红², 邢 达²

(1. 汕头大学医学院第二附属医院神经外科, 中国广东 汕头 515041;

2. 华南师范大学激光生命科学研究所, 中国广东 广州 510631)

摘 要: 目的: 探讨在兔脑皮层动脉粥样硬化时血管内缘流厚度的变化。方法: 用共聚焦激光扫描显微镜比较家兔脑皮质动脉内缘流厚度在正常、粥样硬化病理状态下的不同。结果: 在血管直径为 $74.87 \pm 3.26 \mu\text{m}$ 的血管中血液缘流厚度在病理状态下随血管的舒张、收缩而发生改变; 而在血管直径为 $94.33 \pm 2.84 \mu\text{m}$ 的缘流厚度在血管收缩时发生改变。结论: 动脉粥样硬化的家兔模型中血液缘流厚度随血液的流变性质改变而改变。

关键词: 激光共聚焦扫描显微镜; 血液动力学; 动脉粥样硬化; 血液缘流保护性屏障

中图分类号: Q631; R318.51

文献标识码: A

文章编号: 1007-7146(2004)03-0190-04

Observe the Changing of Edge-flowing Blood Protective Barrier under the Confocal Laser Scanning Microscopy within the Cerebral Cortex Arteries of Rabbit with Atherosclerosis in Vivo

XIANG Zhi-xiong¹, XIE Ze-yu¹, ZHUANG Ming-hua¹, TANG Yong-hong², XING Da²

(1. Department of Neurosurger, Second Affiliated Hospital of Medicine College, Shantou University, Shantou 515041, Guangdong, China; 2. Laser Life Science Institute, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China)

Abstract: **Objective:** To observed the morphological and thickness changing of the protective barrier formed by the edgeflowing blood in vessels within the cerebral cortex arteries with atherosclerosis. **Method:** We have used confocal laser scanning microscopy, dynamically measure the thickness of the protective barrier formed by the edgeflowing blood in vessels within the cerebral cortical arteries of rabbits in the normal contrast group and atherosclerotic group under stimulation with Ligustrazine(or Tetramethylpyrazine) or Noradrenalin. **Result:** In the vessel which diameter is $74.87 \pm 3.26 \mu\text{m}$, the thickness of the protective barrier formed by the edge-flowing blood in vessels was difference between the pathological group and the control group. And the thickness of the edge-flowing blood layerchanged between the vessels were constricting or diastolic in the vessel that diameter was $94.33 \pm 2.84 \mu\text{m}$. **Conclusion:** The thickness of protective barrier formed by the dgeflowing blood in vessels is closely related to atherosclerosis.

Key words: confocal laser scanning microscopy; blood kinetics; atherosclerosis; edgeflowing blood protective barrier

脑动脉粥样硬化 (atherosclerosis) 是严重危害人 类健康的常见病, 其致死率及致残率均位于各种疾

* 基金项目: 广东省科技计划项目课题 (200044)

收稿日期: 2004-02-23

病的前列,给社会带来了严重的负担。其发病机理目前主要倾向于3种假说^[1-3],但是碍于以前研究手段及设备的限制,仍然难以很明确的掌握其中的发病机制。本研究组在前期研究大脑皮质微血管内皮形态的扫描电镜观察中,发现了人类大脑皮质内微血管内皮形态凸凹不平,提出了“血液缘流保护性屏障假说”并予以证明了它的存在及保护作用^[4-6]。为了进一步研究血液缘流层在动脉粥样硬化血管内的变化,本文利用激光扫描共聚焦显微镜观察了不同口径的家兔大脑皮质内动脉的血液的荧光强度,测量了在生理、病理状态下血液缘流层的厚度变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

成年雄性大耳白家兔由广州中医药大学实验动物部提供的成年雄性大耳白家兔30只,体重约2.0 kg~3.0 kg,按随机原则分成正常对照组、病理组两组。对照组给予普通饲料饲养;病理组每日在饲料中加入胆固醇1g、猪油3g、蛋黄1g,同时给予牛血清白蛋白(250mg/kg)注射对血管壁进行免疫损伤^[7]。

1.2 实验仪器

共聚焦激光断层扫描显微镜(MRC600),Bio. Rad公司产品,由华南师范大学激光生命研究所提供。脑定位仪由汕头大学医学院生理教研室提供。荧光素(fluorescein),Aldrich公司产品。

1.3 动物模型制作方法^[8]

取成年雄性大耳白家兔,实验时用3%的戊巴比妥(pentobarbitone)从耳缘静脉注射进行麻醉。将家兔俯卧位固定在脑定位仪上行开颅窗手术:(1)剪去局部兔毛消毒,切开并剥离皮肤,用拉钩拉开皮肤暴露术野;(2)磨钻钻孔,咬骨钳咬去一侧顶骨,用镊子夹起硬膜并剪开,悬吊硬脑膜;(3)将共聚焦激光扫描显微镜对准视野,准备观测,观测开始时经耳缘静脉注入荧光素标记血浆,其中荧光素30mg/5ml/kg;(4)必要时可在行颈总动脉插管术时同时行气管插管术以保持呼吸通畅,并可监测呼吸变化;(5)因本文所采用的开颅窗技术系开放性的,故在观察中为保持脑皮质暴露于大气的局部的微循环环境的各项指标趋近生理状态,用人工脑脊液在皮质表面覆盖一层,以与大气隔离,人工脑脊液配方如下^[9]:KCl 0.22g, MgCl₂ 20.132g, CaCl₂ 20.221g, NaCl

27.710g, NaHCO₃ 21.600g, 尿素 0.402g, 葡萄糖 0.665g溶于1000ml蒸馏水中,并将6%CO₂, 6%O₂, 88%N₂混和气体管通入液体2h,则该液体的pH为7.28±0.02, PCO₂为40.3±3.0mmHg, PO₂为77.0±1.7mmHg,该液体在使用时应水浴保持在37℃。

1.4 脑皮质内微循环扫描观察方法

根据共聚焦激光断层扫描显微镜的成像原理及激光可无伤害性深入皮质内约250μm~300μm深度,并激发荧光标记物发光,对大脑皮质内微血管构筑及微循环进行活体观测,可进行连续断层扫描,层厚2μm;或在同一层面进行连续定位的扫描监测,所摄取图像经监视器及计算机摄入并存盘待分析,共聚焦激光扫描显微镜的扫描参数选择:激发光源Ar⁺激光器(25mW),扫描波长488nm(10mW)。显微镜物镜放大倍数10×,目镜放大倍数10×。为观察血液缘流的变化,通过兔子的耳缘静脉注射不同剂量的去甲肾上腺素(1mg/kg、2mg/kg)及川芎嗪(8mg/kg、16mg/kg)诱导血管进行舒缩运动^[10]。

图像分析系统测量数据:测量不同口径血管的轴流、缘流的荧光辉度,并描绘出荧光辉度曲线,从荧光辉度曲线中求出缘流厚度。测量同等级口径血管在生理、粥样硬化状态及此两种状态下去甲肾上腺素、川芎嗪引起血管运动时,血管内血液缘流厚度的改变。用SPSS软件包做统计学分析处理。

2 结果

在正常组各口径的血管及病理组65.07±1.99μm口径的血管在血管活性物质去甲肾上腺素(1mg/kg、2mg/kg)及川芎嗪(8mg/kg、16mg/kg)作用下,血管出现舒缩运动,但其缘流厚度改变均无统计学意义(见表1、表2)。

在病理组中,血管直径为74.87±3.26μm的缘流厚度在去甲肾上腺素(2mg/kg)作用下缘流厚度与同管径无注射药物时比较p<0.01,差别显著差异;而在川芎嗪(8mg/kg)作用下缘流厚度与无药物组比较p<0.05,差别有统计学意义,在川芎嗪(16mg/kg)作用下缘流厚度与无药物组比较p<0.01,差别有显著差异。在病理组血管口径为94.33±2.84μm中,在不同剂量的去甲肾上腺素作用下缘流厚度与无药物组比较均有显著差异(p<0.01),差别有显著差异(结果见表1、表2)。

表1 正常组各口径血管缘流变化情况

Tab.1 Edge-flowing blood change in the vessel of normal group

分组	血管口径 (μm)	n	缘流厚度
Group	Vessel caliber (μm)	n	Thickness of edge-flowing blood
无血管活性药物组	64.08 \pm 2.61	18	10.54 \pm 1.34
Without vasoactive agent	75.21 \pm 2.66	18	12.34 \pm 1.26
	94.44 \pm 2.06	17	11.60 \pm 1.07
	64.08 \pm 2.61	18	10.73 \pm 1.441
去甲肾上腺素(1mg/kg)	64.08 \pm 2.61	18	10.73 \pm 1.441
Noradrenalin (1mg/kg)	75.21 \pm 2.66	18	11.55 \pm 0.911
	94.44 \pm 2.06	18	11.50 \pm 1.041
	64.08 \pm 2.6	18	10.63 \pm 1.201
去甲肾上腺素(2mg/kg)	64.08 \pm 2.6	18	10.63 \pm 1.201
Noradrenalin (2mg/kg)	75.21 \pm 2.66	18	11.66 \pm 0.901
	94.44 \pm 2.06	18	11.55 \pm 1.061
	64.08 \pm 2.6	18	10.91 \pm 1.251
川芎嗪(8 mg/kg)	64.08 \pm 2.6	18	10.91 \pm 1.251
Lignstrazine (8 mg/kg)	75.21 \pm 2.66	18	11.46 \pm 0.991
	94.44 \pm 2.06	18	11.59 \pm 1.041
	64.08 \pm 2.61	18	10.82 \pm 1.161
川芎嗪(16 mg/kg)	64.08 \pm 2.61	18	10.82 \pm 1.161
Lignstrazine (16 mg/kg)	75.21 \pm 2.66	18	11.55 \pm 0.951
	94.44 \pm 2.06	18	11.60 \pm 1.001

表2 病理组各口径血管缘流变化情况

Tab.2 Edge-flowing blood change in the vessel of physiological group

分组	血管口径 (μm)	n	缘流厚度
Group	Vessel caliber (μm)	n	Thickness of edge-flowing blood
无血管活性药物组	65.07 \pm 1.99	16	7.06 \pm 1.17
Without vasoactive agent	74.87 \pm 3.26	24	7.43 \pm 1.33
	94.33 \pm 2.84	18	9.99 \pm 1.65
	65.07 \pm 1.99	17	6.84 \pm 1.39 ¹
去甲肾上腺素(1mg/kg)	65.07 \pm 1.99	17	6.84 \pm 1.39 ¹
Noradrenalin (1mg/kg)	74.87 \pm 3.26	24	6.57 \pm 0.57 ¹
	94.33 \pm 2.84	18	8.66 \pm 1.21 ²
	65.07 \pm 1.99	17	6.79 \pm 1.19 ¹
去甲肾上腺素(2mg/kg)	65.07 \pm 1.99	17	6.79 \pm 1.19 ¹
Noradrenalin (2mg/kg)	74.87 \pm 3.26	24	6.39 \pm 0.50 ²
	94.33 \pm 2.84	18	7.61 \pm 1.002
	65.07 \pm 1.99	17	6.86 \pm 1.34 ¹
川芎嗪(8 mg/kg)	65.07 \pm 1.99	17	6.86 \pm 1.34 ¹
Lignstrazine (8 mg/kg)	74.87 \pm 3.26	24	8.32 \pm 0.54 ³
	94.33 \pm 2.84	18	9.21 \pm 1.70 ¹
	65.07 \pm 1.99	17	7.22 \pm 1.11 ¹
川芎嗪(16 mg/kg)	65.07 \pm 1.99	17	7.22 \pm 1.11 ¹
Lignstrazine (16 mg/kg)	74.87 \pm 3.26	24	8.46 \pm 0.66 ³
	94.33 \pm 2.84	18	9.58 \pm 1.50 ¹

3 讨论

3.1 病理组与正常组各口径血管缘流比较

在本实验病理组中,血管口径为 74.87 \pm 3.26 μm 的缘流厚度在去甲肾上腺素(2mg/kg)作用下缘流厚度与无药物组比较 $p < 0.01$,而在川芎嗪(8mg/kg)作用下缘流厚度与无药物组比较 $p < 0.05$,在川芎嗪(16mg/kg)作用下缘流厚度与无药物组比较 p

< 0.001 。血管口径为 94.33 \pm 2.84 μm 中,在不同剂量的去甲肾上腺素作用下缘流厚度与无药物组比较均有显著差异($p < 0.01$)。而正常组各口径的血管及病理组 65.07 \pm 1.99 μm 口径的血管在血管活性物质作用下,其缘流厚度改变均无统计学意义。根据前期的实验结果^[6]表明:在血管内,缘流层在血管舒张和收缩过程中,该截面的缘流相应地增厚来对血管内皮细胞进行保护。所以从动脉粥样硬化病理组

结果看出,血液缘流厚度在血管运动过程中厚度变化明显,在收缩时缘流厚度变薄,而在舒张过程中则增厚。这种表现在平均管径为 $74.87 \pm 3.26 \mu\text{m}$ 的血管内更加明显;而在正常组的血管内缘流厚度则无论在舒张或收缩过程中均能保持在一定的范围。结合血液动力学及血液流变学知识^[11]可以推论出:在血管扩张时由于在同一截面通过的血液量是一定的,因而血液流速减慢。由于动脉粥样硬化的兔子血液粘稠度较正常兔子明显增大,故在血流中,其血管中央的轴流与靠近管壁的缘流分界更模糊,所以血液中的黏性物质如脂质等成分更接近管壁,缘流厚度增加,而脂质等有形物质更容易在管壁发生沉积。在血管收缩过程中,由于血液流速加快,从而缘流层液体也相应加快,故部分缘流层则与轴流融合,缘流层变薄,其对血管内皮细胞的保护性减弱,同时血液流速加快、血液对管壁的剪切力等,对血管内皮细胞造成损伤。由于以血浆成分为主要构成的缘流保护层变薄,高脂血症时血液粘稠度增大,血流的剪切力改变等原因造成了内皮细胞完整性受损,血管管壁脂质等物质沉淀等诸多原因结合,最终使血管壁动脉粥样硬化斑块形成。从大量研究结果表明,内皮细胞完整性破坏是血管性疾病发生的始动环节^[12],因而在高脂血症的诱导下动脉硬化的发生是必然的。

3.2 脑动脉粥样硬化治疗的展望

从我们的研究结果看出缘流保护性屏障在整个动脉粥样硬化病理形成过程中的保护作用,所以我们在研究设计药物时,可以把重点放于保持血管内适当的缘流厚度。降低血液中的脂质成分含量如他汀类或树脂类药物,降低血液粘稠度如阿魏酸钠,降纤酶,蝮蛇抗栓酶,减少内源性代谢产物对内皮细胞的毒害作用的药物,如维生素类等,这些都是保持适当缘流的厚度行之有效有效的手段。如何能更好将这几方面结合起来则需要进一步的研究。

References

[1] ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis[J]. N Engl J

Med, 1976, 295:369-377.

- [2] TITUS J L. Blood vessels and lymphatics[M]. St Louis: CV Mosby Com, 1990:752.
- [3] MANO J T, FRANCIS R. Pressure-induced arterial wall stress and atherosclerosis[J]. Ann Thorac Surg, 1995, 59: 1594-1563.
- [4] ZHUANG Ming-hua, HUANG Ji-qian, JIANG Shu-qian, et al. The appearance of cerebral blood vessel endothelium and the protective barrier formed by edge-flowing blood[J]. Chinese J Microcirculation, 1996, 6 (1): 10.
- [5] ZHUANG Ming-hua, BAI Ye, HUANG Ji-qian, et al. Testimony for hypothesis of protective barrier formed by edge-flowing blood in vessel[J]. Chinese J Microcirculation, 1998, 8 (1): 3-5.
- [6] ZHUANG Ming-hua, BAI Ye, HUANG Ji-qian, et al. A kind of rabbit animal model for confocal laser scanning microscopy was used in a rabbit opening cranial window preparation in order to observe the microcirculation within the cerebral cortex[J]. Chinese J Microcirculation, 2003, 13(2): 45-47.
- [7] YAO Guo. The animal model of man and disease[M]. Beijing: The People Health Publishing Company, 1982. 52.
- [8] ZHUANG Ming-hua, HUANG Ji-qian, CHANG Li-gong, et al. Confocal laser scanning microscopy was used in observe the capillary vessel angioarchitecture and microcirculation within the cerebral cortex *in vivo*[J]. Anatomy Advancement, 1995, 1(1): 48.
- [9] YE Qian, XIAO Xiong. The investigation tropesis of pars cerebri microcirculatory in the near future[J]. Breathing and Circulation, 1980, 28:339.
- [10] CHANG Li-gong, et al. Inhibition effect of vasomotion by tetramethylpyrazine in rabbit mesentery small artery[J]. Chinese J Microcirculation, 1994, 4(3): 11-15.
- [11] WU Zai-bin. The dynamics of blood flow[M]. Xining: Qinghai People Publishing House, 1981. 234-250.
- [12] WEI Shu-qian, ZHANG Li, XIA Hong-tian, et al. The pathosignificance of vascular endothelial cell damage within process of multiple organ failure[J]. Chinese J Microcirculation, 1993, 3 (1): 1.



乡志雄:男,1977年出生。2001年毕业于汕头大学医学临床医学系,获医学学士学位。目前正于汕头大学攻读神经外科硕士。

作者简介

Biography

XIANG Zhixiong: male, born in 1977, graduated from Shantou University Medical College in 2001. He is going on study for the postgraduate on neurosurgery now.
E-mail: zhxx-shantou@sohu.com