



缺血性脑梗塞CT表现与梗塞后神经细胞凋亡及坏死的相关性

脑血管病所致死亡约占人类总死亡率的8%~15%，而缺血性脑梗塞约占各种脑血管病的70%~80%[1]。CT对缺血性脑梗塞的早期诊断、定性及预后评估有重要意义。目前认为防止半暗区发生凋亡进而梗塞区发生坏死是缺血性脑梗塞治疗的关键，许多研究表明抗凋亡措施可使预后大为改善[2]。本研究通过建立急性缺血性脑梗塞动物模型，测量梗塞区及其周围脑组织细胞凋亡、坏死、水肿情况，探讨缺血性脑梗塞早期的CT表现、分期与实际神经组织细胞损伤的关系，及与临床诊断、治疗及预后的相关性。

1 材料和方法

1.1 实验动物及脑梗塞模型制作

新西兰兔32只，随机分为对照组及脑梗塞后2、4、8、12、18、24、36 h组共8组，每组4只。兔麻醉后，切开皮肤，分离并暴露左颈总动脉、左颈内动脉、颈外动脉。在左颈外动脉的起始处用动脉血管夹夹闭颈外动脉，用20G的静脉套管针从颈总动脉穿刺[3][4]，穿刺成功后注入约20粒大小为300~500 μm 的PVA栓子。注射完毕，拔出静脉套管针，缝合穿刺点和切口。动物模型送动物房观察，分别在各时间点行头部CT扫描。对照组仅暴露左颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉，不注入栓子，其它过程均与实验组相同。

1.2 CT扫描方法

兔仰卧位放入头托内，以眶后缘为基线，3 mm层厚，螺距为1，向后设定11~12层至枕骨大孔。按上述设定行轴位扫描。扫描条件：电压120 kV，电流130 mA，重建矩阵512 \times 512。兔术前先做1次本底CT，对照组及各实验组分别于术后各时点行CT扫描。调节窗宽60 Hu，窗位50 Hu，使脑实质显示最佳，照相。分别测量各组两侧基底节、颞叶皮质和海马的CT值，求出两侧CT值的比值。

1.3 神经组织细胞损伤的观察与检测

兔于末次CT扫描后，处死取出脑组织，置于3.7%的多聚甲醛溶液内固定24 h。在基底节部和颞叶皮质区各取2 mm厚的脑组织片，每块组织制成6张切片，2张HE染色，2张Nissle染色，2张免疫组化染色(TUNEL法)。HE染色和Nissle染色的步骤按常规方法。TUNEL检测的步骤：(1)切片在烤箱内60 $^{\circ}\text{C}$ 融蜡后于二甲苯中脱蜡2次，每次5 min；(2)于100%、90%、80%、70%酒精中梯度脱水；(3)置于10%甲醇双氧水溶液中30 min；(4)加50 μl 蛋白酶K溶液，在18~24 $^{\circ}\text{C}$ 室温孵育10~30 min；(5)加标记混和液50 μl ，在37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育1 h；(6)加反应终止液5 min，在18~24 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应；(7)加50 μl Streptavidin-HRP液，在37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育30 min；(8)加DAB溶液显色，避光在室温下放置5~10 min，观察显色情况；(9)70%、95%、100%乙醇各2 min，各2次；二甲苯2次，每次2 min；(10)中性树胶封片。其中(2)~(9)步均在加液前用BPS冲洗2次，每次5 min；在37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育时需加盖盖玻片。

1.4 统计学处理

根据CT表现将脑梗塞进行分期，统计各组例数，用SPSS 10.0软件进行统计学分析。各组间比较用方差分析；细胞凋亡、坏死率构成比的比较用卡方检验。

2 结果

2.1 脑梗塞CT表现

梗塞后2~8 h病灶出现于基底节, 首先左侧脑实质内可见到局部片状密度减低影, 较对侧对应区域的CT值稍降低。接着左侧基底节部轻微肿胀, 密度下降, 与周围脑质分界不清, 较对侧对应区域低5~10 Hu。然后梗塞区由左侧基底节部向整个缺血区蔓延, 颞、额叶灰质及白质密度降低, 但尚未形成明确的边界, 较对侧对应区域低7~12 Hu。在4~8 h病灶进展较慢, 将这些CT表现规定为I期。梗塞后12~18 h CT表现: 左侧基底节消失, 颞、额叶灰、白质呈低密度影, 侧脑室受压变形, 中线结构向对侧移位; 大脑中动脉供血区呈边界清楚的梗塞灶, 较对侧对应区域低12~15 Hu。在8~12 h出现另一次进展加速, 病灶向皮质区扩大。将这些CT表现规定为II期。梗塞后24~36 h CT表现: 上述改变更明显, 左侧大脑半球肿胀, 脑膨出。将这些CT表现规定为III期。

2.2 组织细胞的表现

光镜表现: HE和Nissle染色显示坏死细胞即红神经元和鬼影细胞, 散在分布于缺血区, 8 h以后可见。TUNEL染色观察可见凋亡细胞有多种形态, 凋亡细胞着色深, 呈圆形、新月形和凋亡小体, 2 h出现。在缺血性损伤的基底节, 有一些染色质浓缩, 呈深红色的圆形或卵圆形的凋亡细胞, 额顶皮质的凋亡细胞少而稀疏。随着时间的推移, 在4~12 h凋亡细胞的数量较前增多, 除上述形态的凋亡细胞外, 可见染色质聚边呈新月形的凋亡细胞, 同时可见散在的坏死细胞, 其胞体较大着色浅, 呈淡红色。12~18 h凋亡细胞亦渐增多, 并由基底节周围逐渐向脑皮质移行。18~24 h后凋亡细胞散在分布于额顶皮质, 皮质内III~VI层凋亡细胞较I~II层多, 基底节区以坏死细胞为主。凋亡细胞在36 h达到高峰, 坏死细胞由于核膜、细胞膜破裂, 染色质弥散导致细胞体积大、着色浅淡而不均匀。凋亡细胞大多分布于缺血的边缘区, 并常散布于正常神经元中间, 缺血中心区少见。其形态表现为整个神经元呈浓缩状态, 胞核、胞浆深染, 细胞体积缩小。处于凋亡早期的神经元胞浆浓缩、胞膜结构完整。至凋亡晚期, 染色质常完全聚集在一起, 形成一大的高电子密度的染色质团块, 继之神经元核形成凋亡小体。此外, 我们还发现, 个别神经元具有凋亡及坏死的双重形态学特征, 表现为核染色质溶解, 但细胞膜及核膜结构完整。

梗塞后不同的时间组别间神经细胞损伤率存在差异。按CT分期后, 各期别间神经细胞损伤率存在差异, 经统计学处理, I期、II期、III期之间均具有显著性差异($P < 0.05$)。

3 讨论

急性期的缺血性脑梗塞可分为中心坏死区、半暗区及正常区。存在于脑梗塞中心坏死区边缘尚能存活的脑组织为半暗区, 该区细胞结构存在但功能受损。凋亡细胞大多分布于缺血的边缘区, 并常散布于正常神经元中间, 缺血中心区少见, 细胞坏死发生于缺血中心区[5][6][7]。对急性脑梗塞的诊断, MRI的最大优点在于对缺血性损伤有很高的敏感性, 但MRI的信号改变缺乏特异性。尤其对脑血管意外的患者来说, MRI在辨别是脑缺血还是脑出血方面存在困难[8][9]。就这点而言, CT的特异性要比MRI好, 因为急性脑出血和急性脑梗塞在CT上呈现截然不同的影像, 前者为高密度改变, 后者为低密度改变。

脑实质密度降低的基本病理主要为血脑屏障受损时缺血性脑梗塞含水量有所增加。CT值与组织的含水量密切相关, 含水量增加1%, 相当于降低2.5 Hu[10][11]。观察早期脑梗塞灶的CT密度改变, 重点应放在灰质区。最低CT值的测定则特征性地反映了梗塞区的密度, 更能正确的反映早期梗塞灶的密度改变[12]。

缺血性脑梗塞后不同的时间点其病理基础及CT表现不同, 将CT表现分为I、II、III期。I期重新恢复血供临床效果最佳, II期次之, III期最差。急性脑血栓的溶栓治疗时机在6 h之内为最佳时间窗, 本实验建议将溶栓时间延长至8 h。因为在4~8 h病灶进展较慢, 这样就可以为较多的患者争取到溶栓时间, 改善预后。

半暗带可提供了一定时间, 这为脑梗塞的治疗提供了一个时间窗。抓住时机, 在这个时间窗内采取干预措施, 促使半暗带向正常组织转化是脑梗塞治疗最重要的目的。近来研究表明[11], 脑梗塞时不增加血流的治疗方法亦可使梗塞面积明显减少。因此, 除了尽早采取改善血流的措施外, 尽早期使用“脑保护剂”及抗凋亡治疗, 以阻断缺血性病理过程中的某个环节, 从而减轻缺血性脑损害。脑局灶缺血损害是一个过程, 神经功能障碍随时间延长而加重, 缺血边缘的神经元可以存活几小时至几天, 呈迟发性损害。如果侧支循环建立, 半暗区的脑神经功能仍可恢复。由于半暗带存在的时间较短, 因此必须争分夺秒, 尽早、合理的治疗, 以促使半暗带向正常组织的转变, 减轻缺血性脑损害。

参考文献:

- [1] 刘红梅, 高天明, 佟振清. 急性脑缺血动物模型实验研究进展[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(4): 368-70.
Liu HM, Gao TM, Tong ZQ. Experiment study in animal model of acute cerebral infarction [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(4): 368-70.
- [2] 谭晓华, 姜泊, 张亚历, 等. 凋亡细胞核DNA片段检测方法进展[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(4): 371-3.
Tan XH, Jiang B, Zhang YL, et al. Examination method of apoptosis nucleolus of DNA fragmentation apoptosis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(4): 371-3.
- [3] 刘红梅, 佟振清. 脑缺血与神经细胞凋亡[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(1): 55-8.
Liu HM, Tong ZQ. Cerebral ischemia and apoptosis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(1): 55-8.
- [4] 赵永生, 赵峰, 杨淑琴, 等. 急性脑梗塞的动物模型及临床应用研究[J]. 中国医学影像技术, 2001, 17(2): 125-7.
Zhang YS, Zhang F, Yang SQ, et al. Experiment study in animal and clinical application of acute cerebral infarction[J]. Chin Med Imaging Tech, 2001, 17(2): 125-7.
- [5] Anthony M, Andrw D, Melanie B, et al. Ischemic core and penumbra in human stroke[J]. Stroke, 1999, 1(6): 93-6.
- [6] Kensuke MK, Takeo KD, Pak H. Reperfusion following focal cerebral ischemia alter distribution of neural cells with DNA fragmentation in mice[J]. Brain Res, 1997, 7(51): 161-4.
- [7] Yi L, Michael CP, Ning J, et al. Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 1995, 26(7): 1254-7.
- [8] Koeing MD, Ernst DP, Lothar H, et al. Perfusion CT of the brain: diagnostic approach for early detection of ischemic stroke[J]. Radiology, 1998, 209(1): 85-93.
- [9] Gillard JH, Bearcroft PW, Miles KA. Evaluation of quantitative cerebral CT perfusion with positron emission tomography results[J]. Radiology, 1997, 205(1): 185-90.
- [10] Heiss WD. Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(9): 1276-93.
- [11] 刘德海, 夏蔚宗, 张仲伟, 等. 急性缺血性脑梗死105例CT表现及其病理分析[J]. 中国医学影像技术, 2001, 17(3): 221-3.
Liu DH, Xia WZ, Zhang ZW, et al. Analysis of CT manifestation and pathology of acute ischemic cerebral infarction[J]. Chin Med Imaging Tech, 2001, 17(3): 221-3.
- [12] 陈彦芳, 吴恩惠, 刘国栋, 等. 实验性急性脑梗塞早期CT表现与病理基础研究[J]. 中华放射学杂志, 1994, 28(12): 843-6.
Chen YF, Wu EH, Liu GD, et al. Acute cerebral infarction: Early CT appearances and histologic findings in cat model[J]. Chin J Radiol, 1994, 28(12): 843-6.

参考文献:

- [1] 刘红梅, 高天明, 佟振清. 急性脑缺血动物模型实验研究进展[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(4): 368-70.
- Liu HM, Gao TM, Tong ZQ. Experiment study in animal model of acute cerebral infarction [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(4): 368-70.
- [2] 谭晓华, 姜泊, 张亚历, 等. 凋亡细胞核DNA片段检测方法进展[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(4): 371-3.
- Tan XH, Jiang B, Zhang YL, et al. Examination method of apoptosis nucleolus of DNA fragmentation apoptosis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(4):371-3.
- [3] 刘红梅, 佟振清. 脑缺血与神经细胞凋亡[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(1): 55-8.
- Liu HM, Tong ZQ. Cerebral ischemia and apoptosis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(1): 55-8.
- [4] 赵永生, 赵峰, 杨淑琴, 等. 急性脑梗塞的动物模型及临床应用研究[J]. 中国医学影像技术, 2001, 17(2): 125-7.
- Zhang YS, Zhang F, Yang SQ, et al. Experiment study in animal and clinical application of acute cerebral infarction[J]. Chin Med Imaging Tech, 2001, 17(2): 125-7.
- [5] Anthony M, Andrw D, Melanie B, et al. Ischemic core and penumbra in human stroke[J]. Stroke, 1999, 1(6):93-6.
- [6] Kensuke MK, Takeo KD, Pak H. Reperfusion following focal cerebral ischemia alter distribution of neural cells with DNA fragmentation in mice[J]. Brain Res, 1997, 7(51): 161-4.
- [7] Yi L, Michael CP, Ning J, et al. Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 1995, 26(7): 1254-7.
- [8] Koeing MD, Ernst DP, Lothar H, et al. Perfusion CT of the brain: diagnostic approach for early detection of ischemic stroke[J]. Radiology, 1998, 209(1): 85-93.
- [9] Gillard JH, Bearcroft PW, Miles KA. Evaluation of quantitative cerebral CT perfusion with positron emission tomography results[J]. Radiology, 1997, 205(1): 185-90.
- [10] Heiss WD. Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(9): 1276-93.
- [11] 刘德海, 夏蔚宗, 张仲伟, 等. 急性缺血性脑梗死105例CT表现及其病理分析[J]. 中国医学影像技术, 2001, 17(3): 221-3.
- Liu DH, Xia WZ, Zhang ZW, et al. Analysis of CT manifestation and pathology of acute ischemic cerebral infarction[J]. Chin Med Imaging Tech, 2001, 17(3): 221-3.
- [12] 陈彦芳, 吴恩惠, 刘国栋, 等. 实验性急性脑梗塞早期CT表现与病理基础研究[J]. 中华放射学杂志, 1994, 28(12): 843-6.
- Chen YF, Wu EH, Liu GD, et al. Acute cerebral infarction: Early CT appearances and histologic findings in cat model[J]. Chin J Radiol, 1994, 28(12): 843-6.