

气候突变对脑卒中大鼠发病的影响

李立华¹ 刘晓燕² 郭霞珍² 杨云霜³

(1 北京市顺义区中医医院, 北京, 101300; 2 北京中医药大学, 北京, 100029; 3 第二炮兵总医院中医科, 北京, 100088)

摘要 目的:改进易卒中肾性高血压大鼠的造模方法,并在此研究上气候突变对脑卒中大鼠发病的影响。方法:不完全暴露肾脏,以体表定位的方法寻找双肾动脉,复制易卒中肾性高血压大鼠模型(RHRSP),待大鼠血压升高到一定程度把它们放置于人工模拟气候箱中,给予气温骤然升降的刺激,观察脑卒中大鼠发病情况。结果:改进后的造模方法使大鼠术后死亡率低,血压升高快,卒中率高。气温骤升组的模型组大鼠血压值在造模45 d左右稳定在220~230 mmHg之间,气温骤降组的模型组大鼠血压值稳定在205~220 mmHg之间;模型组与生理组,假手术组的血压值有统计学意义($P < 0.05$)。气温骤然升降的变化影响RHRSP脑梗死及脑出血发生的几率。结论:采用体表定位的方法,可以减少大鼠的并发症及死亡率并且提高大鼠的脑卒中发生率。血压升高、气候突变的刺激是脑血管疾病发病的一个重要诱因;气温骤然升降可导致两种不同的结局:气温骤升导致RHRSP发生脑梗死的几率稍高,而气温骤降导致该模型大鼠脑出血发病率稍高。

关键词 气候突变;脑卒中;易卒中肾性高血压大鼠

Effect of Abrupt Climate Change on the Incidence of Cerebral Stroke in Rats

Li Lihua¹, Liu Xiaoyan², Guo Xiazhen², Yang Yunshuang³

(1 Shunyi District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing 101300, China; 2 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3 Artillery Hospital, Traditional Chinese Medicine Department, Beijing 100088, China)

Abstract Objective: To explore how to improve the model of RHRSP, and the effect of abrupt climate change on the incidence of cerebral stroke in rats. **Methods:** Body surface location method was used to locate the double renal arteries without exposing the kidney. "RHRSP" rat model was made and then put into an artificial climate simulation box, the incidence of the stroke was observed when the temperature was increased or decreased abruptly. **Results:** The improved model making method caused low death rate, quick blood pressure rise and high stroke rate. The blood pressure was stabilized to between 220 and 230 mmHg after the model was made for around 45 d in the sharp temperature rise group, and 205-220 mmHg in the sharp temperature drop group; the blood pressure values were statistically significant ($P < 0.05$) in the model group, physiology group and sham-operation group. Sudden temperature change affected the incident rate of cerebral infarction and cerebral hemorrhage in RHRSP. **Conclusion:** Body surface location method can decrease complication in rats and death rate as well as increasing the incidence rate of cerebral stroke in rats. Blood pressure elevation and abrupt climate change are important inducements to cause cerebrovascular disease; sudden temperature change can cause two different **Results:** there is high incidence of cerebral infarction in RHRSP when the temperature rises sharply and high incidence of intracerebral hemorrhage when the temperature drops suddenly.

Key Words Abrupt climate change; Cerebral stroke; RHRSP

中图分类号:R226 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.03.027

脑卒中一直以来都是发病率、病死率、致残率极高的一种疾病,它的发病与气候,季节变化有密切的关系^[1-8]。不少学者已对这种相关关系做了研究,得出结论:夏季脑梗死发病率高,冬季脑出血发病率高。但其中的相关机制究竟是怎样的,目前研究阐明的较少,需要科学研究进一步探讨。因此,本课题组在前期的工作基础上欲对此机制进行研究。首先需要建立与人体发生脑卒中过程较为相似的大鼠模

型——暨成功复制易卒中肾性高血压大鼠模型。其次,研究气候突变(骤然升降)对该模型大鼠发病率的影响。通过以上研究,为进一步阐明脑卒中的发生机理做铺垫,同时也可在一定程度上揭示气候因素在脑血管病发病的重要地位。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 体重80~100 g的健康雄性SD

基金项目:北京市自然科学基金项目(编号:7072038)

作者简介:李立华(1983—),女,博士研究生,导师郭霞珍,研究方向:“四时五脏阴阳”理论及实验研究,E-mail:lihuibear@126.com,地址:北京中医药大学56信箱,邮编:100029

通信作者:刘晓燕(1971—),女,博士,副主任医师,研究方向:“四时五脏阴阳”理论及实验研究,E-mail:Liuxy1088@sina.com

大鼠共 200 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 CKX(京)2008-0001。随机分为气温骤升组 40 只,气温骤降组 40 只,假手术组各 30 只,生理组各 30 只。在温度为 25 ℃(夏季)和 17 ℃(冬季)的动物房中以普通鼠全价颗粒饲料喂养,自由饮用自来水。

1.1.2 试剂和仪器 TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色剂);BP-2006A 大鼠无创血压计(Softron,日本);人工模拟气候箱(北京中医药大学基础医学院自主设计);内径为 0.30 mm 的 U 型银夹(中山医科大学神经内科研制)。

1.2 实验方法

1.2.1 易卒中型肾性高血压大鼠模型的改进^[9-10]

常规被皮消毒后,使用 3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行腹腔注射,待大鼠麻醉后沿其胸骨剑突下 1 cm 处向下行纵行一长约 1~1.5 cm 的切口,打开腹腔。依次暴露下腔静脉、左肾静脉、腹主动脉、部分动静脉分支,用棉球向下轻压肾静脉直至后方动脉显露出来,若肾动、静脉已成功分离,可用玻璃分针挑起左肾动脉,然后用预先准备的 0.3 mm(内径)银夹夹闭该处动脉。右肾动脉的定位较左边稍困难,原因是:此动脉位于肠系膜上动脉和下腔静脉之间。首先定位肠系膜上动脉(该动脉下方有一根腹主动脉分支,这个分支较细),此即右肾动脉。找到右侧肾动脉后,用同样的方法擦拭分离周边组织,后上银夹钳夹。夹银夹需要注意的事项:第一,确认双侧肾动脉都被放置于银夹的“U”中,银夹头部只需要轻轻闭合。第二,检查大鼠血流是否通畅,是否无栓塞,大鼠腹腔内有无出血,夹置于其中的肾动脉有无扭转。银夹摆放平整后,仔细检查腹腔,将腹腔中的棉球一一取出,创口处洒少量青霉素,然后逐层缝合,肌层采用 8 字缝合,皮肤采用连续缝合。术后三天每天注射青霉素 5 000~10 000 U,预防感染。

1.2.2 血压监测及气候突变的处理 大鼠造模后,3 组大鼠都从第 3 周开始每周测量一次血压(收缩压),进行气温骤升刺激的观察 90 d,进行气温骤降的观察 45 d。在进入人工模拟气候箱前测量体重、血压,观察大鼠的一般情况。采用 Longa5 分制法评分,将 Longa=0 的模型组大鼠、假手术组和生理组的大鼠都置于人工气候箱中,分别在温度 25 ℃和 17 ℃,相对湿度 60% 的环境中饲养 2 周。将气温骤升组的温度设置为 37 ℃ 8 h(日最高气温 ≥ 35 ℃时定义为高温天气),温度恢复至 25 ℃,第 2 d 重复升温过程 1 次,同样为 8 h,随后出箱。将气温骤降组的

温度设置为 5 ℃ 8 h(24 h 内降温 10 ℃以上为寒潮天气),温度恢复至 17 ℃,第 2 天重复降温过程 1 次,同样为 8 h,随后出箱。3 组大鼠都于出箱后立即取材。

1.2.3 TTC 染色及病理检查 大鼠麻醉(麻醉药物:10%水合氯醛;剂量:300 mg/kg)。采血(取血方法:大鼠腹主动脉采血)-小闸刀断头取脑。将大鼠全脑放置于(温度设定为-20 ℃的)冰箱冷冻 10 min。10 min 后大脑组织稍稍变硬,此时固定较易,用刀片将其均分切成 2 毫米厚的薄片。在进行 TTC 染色之前,先观察每只大鼠脑组织有无出血,无出血的组织块放置于 TTC 染液瓶中观察其梗死情况。最后将余下的大鼠脑组织放置于制备好的 4% 的多聚甲醛溶液中进行固定(时间大约 2 周),石蜡切片后 HE 染色,光镜下观察。

1.2.4 统计学处理、分析 使用 SPSS 11.0 统计软件。资料数据($\bar{x} \pm s$),经 t 检验后 $P < 0.05$ 认为数据差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型改进 此造模方法与以往的文献所报导的大鼠模型相比:血压升高的更快,发生卒中的时间较短,最早发生卒中的时间是造模后 4 周。

2.2 气温骤升

2.2.1 气温骤升刺激后大鼠的整体状态、血压变化(见表 1) 生理组大鼠在气温升高前的 Bp 均值为(129.30 $\pm$ 3.95) mmHg,而同种状态下,假手术组大鼠模型的 Bp 均值为(105.10 $\pm$ 2.94) mmHg,RHRSP 模型组的血压为(226.07 $\pm$ 8.91) mmHg。将人工气候模拟箱的温度设置成 37 ℃后的 1 h,这 3 组大鼠均出现燥热、易激惹现象:毛发竖起,口渴欲饮水,活动较温度刺激前明显增多,来回跳动、龇牙咧嘴、易攻击同伴。待升温刺激结束后各组大鼠逐渐趋于平静,蜷卧于鼠笼中。每个模型组大鼠在温度升高刺激后 Bp 值有不同程度升高。

2.2.2 卒中情况 3 组大鼠在模型复制成功后 90 d 均给与 37 ℃骤然升温的刺激,温度刺激结束后发现:RHRSP 组脑梗死发生率为 45%。另外,在肉眼观察下,发现有 2 只大鼠大脑组织出现大片出血灶。

2.2.3 大鼠脑组织的病理变化(见图 1) 正常组大鼠脑组织被 TTC 染色剂染成红色。发生脑梗死的脑组织在染色时无法着色,肉眼观察下表现为白色;而光镜下表现为胶质细胞大量增生。出血的脑组织不需要放置在 TTC 染色液中。肉眼可看到大小不等的红色组织,呈点状、斑块状、圆球状;在光镜

下则表现为血管管壁或增厚、或管腔狭窄,甚者出现动脉管壁的脂质透明样变、纤维素样坏死。

表 1 各组各个时间段血压值比较 (mmHg)

时间	生理组	假手术组	模型组
造模后 2 周	107.60 ± 11.75	103.37 ± 5.16	150.49 ± 25.91 **
造模后 3 周	119.80 ± 15.56	103.53 ± 3.64	179.92 ± 30.43 **
造模后 4 周	123.20 ± 17.55	103.50 ± 3.49	212.69 ± 11.95 **
造模后 5 周	124.60 ± 15.09	104.40 ± 3.04	232.03 ± 35.62 **
造模后 6 周	128.40 ± 11.18	104.03 ± 3.20	228.33 ± 12.50 **
造模后 7 周	135.00 ± 9.27	104.33 ± 3.28	223.38 ± 8.62 **
造模后 8 周	131.10 ± 13.96	104.07 ± 3.70	228.52 ± 10.28 **
造模后 9 周	129.30 ± 3.95	105.10 ± 2.94	226.07 ± 8.91 **

注:与生理组,假手术组比较, ** $P < 0.01$ 。

表 2 各组每个时间段血压值比较 (mmHg)

时间	生理组	假手术组	模型组
造模后 2 周	105.10 ± 3.90	104.00 ± 3.69	133.39 ± 7.17 **
造模后 3 周	104.50 ± 3.87	102.39 ± 4.27	167.37 ± 13.52 **
造模后 4 周	103.10 ± 2.13	103.56 ± 4.00	188.25 ± 26.10 **
造模后 5 周	103.50 ± 3.06	103.22 ± 3.41	207.85 ± 19.87 **
造模后 6 周	105.00 ± 2.49	103.39 ± 3.55	213.10 ± 12.68 **
造模后 7 周	104.00 ± 3.00	104.78 ± 3.28	206.64 ± 20.08 **

注:与生理组,假手术组比较, ** $P < 0.01$ 。

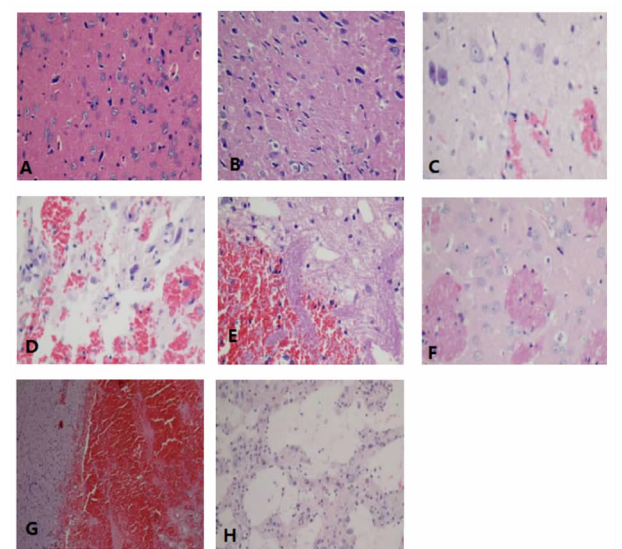


图 1 各组大鼠脑部的组织形态 (HE × 40)

注:A. 生理组;B. 假手术组;C. 升温组出血点;D. 升温组出血灶;E. 升温组出血合并空囊;F. 降温组出血点;G. 降温组出血灶;H. 降温组空囊

2.3 气温骤降

2.3.1 气温骤降刺激后大鼠的整体状态、血压变化 (见表 2) 生理组、假手术组和 RHRSP 模型组大鼠在温度调至 5℃ 之前的 Bp 均值分别是: (104.00 ± 3.00) mmHg、(104.78 ± 3.28) mmHg、(206.64 ± 20.08) mmHg。气温骤降的刺激结束后模型组大鼠的 Bp 值升高,而另外 2 组大鼠无明显变化。将人工

气候模拟箱的温度设置成 5℃ 后的半个小时观察大鼠一般状况发现:各组大鼠均表现为饮水减少、寒颤、蜷缩成团甚至两两相拥。如受到外界刺激,也会处于假亢奋状态,之后仍蜷卧一角,呈瑟瑟发抖状。

2.3.2 卒中情况 成功复制各组大鼠模型后 45 d,给与它们相同条件的骤然降温刺激。降温刺激结束后 RHRSP 模型组大鼠脑出血发生率 65%。经过 TTC 染色没有发现梗死的大鼠。

2.3.3 病理改变 (见图 1) 正常组大鼠的脑组织与气温骤升组一样无明显改变。出血的脑组织在光镜下观察表现为:脑内局部小动脉硬化,具体有血管管壁增厚、某些血管管腔变窄。此次出血的脑组织大多呈现的是小的、散在出血点,有些脑组织出血水肿、或具有空泡的软化灶,更有甚者出现大片出血灶,空囊形成。

3 讨论

3.1 造模方法的特点 此造模方法是在黄如训^[9]教授“双肾双夹”模型基础上进行改进,与其他高血压大鼠模型^[11-15]相比较具有以下特点:1)通过下腔静脉和腹主动脉寻找肾动脉,不完全暴露肾脏,不会对肾脏牵掣反转而造成肾脏损伤。2)采用体表定位的方法,使得腹部手术开口比传统方法小。3)不完全暴露肾脏,可以腹腔感染的几率,避免由于肠组织回放顺序紊乱出现肠梗阻,减少手术后并发症、病死率的发生。4)采用对血管伤害性较少的棉球及玻璃分针擦拭、分离结缔组织,可以减少附近血管及相关脏器的损伤。故该方法造模模型成功率高。

3.2 高血压与脑卒中 高血压病 (EH) 是脑卒中的重要危险因素之一。有研究发现,脑中风的发生率随血压的增高而增加。高血压是脑卒中的重要独立危险因素,这已被医学界所公认。^[16] 血压可以作为出血性脑卒中预后的预测因素之一。鉴于此,本研究拟选取卒中型肾性高血压大鼠 (RHRSP) 作为研究气温骤升、骤降诱发脑卒中的动物模型。

3.3 气温突变诱发脑卒中 本研究发现:RHRSP (气温骤降) 大鼠在模型成功复制 4 周 Bp 均值就达到 (188.25 ± 26.10) mmHg,造模 6 周 Bp 稳定在 200 mmHg 左右。气温骤降刺激后脑出血发生率高达 65%,较另 2 组大鼠脑卒中发生率明显增高。这次实验研究的结果与以往文献所报导的冬季发生脑出血较多相一致。与此同时,本研究亦表明,脑卒中的大鼠均发生皮质、髓质的损伤,肢体出现偏瘫,Longa ≥ 2 分。而在气温骤升的刺激下,RHRSP 大鼠的脑卒中发生率为 45%,与前期文献报道相符。除此之

外,气温骤升不仅可诱发脑梗死,也可诱发出血。在临床研究发现,在高温状态下,人体汗腺分泌增多,使具有脑血管基础病的患者的血容量减少,血液黏稠,管腔狭窄,易于阻塞,更易导致脑梗死的急性发作。

脑卒中的发生最主要的病变基础责之于脑血管病变。长期寒冷刺激可导致脑内局部血管壁发生纤维样坏死、脂质透明变性,甚至小动脉瘤或、夹层动脉瘤形成。一旦遭遇血压骤然升高,血液渗出或动脉瘤破裂,血液就破入室形成血肿。另一方面,突遇外界冷空气强刺激后,远端血管发生痉挛,血管出现缺氧、坏死,局部出血、血栓形成,血液大片融合^[17]。

本研究表明,气温骤变是脑卒中发生的诱因,气温骤升导致 RHRSP 发生脑梗死的几率稍高,而气温骤降导致该模型大鼠脑出血发病率稍高。但究竟是什么机理还不清楚,还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Klimaszewska K, Kulak W, Jankowiak B. Seasonal variation in ischaemic stroke frequency in Podlaskie Province by season[J]. AdvMed Sci, 2007, 52 (Suppl 1): 112 – 114.
- [2] 孙德娟, 邱碧秀, 毛铁英. 脑卒中的季节性发病及预防[J]. 黑龙江医药, 2007, 20(3): 281.
- [3] 朱宏勋, 曹锐, 胡文忠, 等. 季节对北京地区急性脑梗塞患者中医症候的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(9): 2114 – 2116.
- [4] 刘诗英, 张昆南, 俞慧强, 等. 在不同气温条件下高血压病患者发生脑梗死的急性期血压与近期预后的关系[J]. 实用医学杂志,

2011, 27(22): 4040 – 4043.

- [5] 王岩, 祝茗, 郭春妮, 等. 应用圆分布结合候温法分析上海地区季节变化与急性缺血性卒中发病分布规律[J]. 中风与神经疾病杂志, 2013, 30(2): 124 – 127.
- [6] 晋守博, 石卉, 沈进. 脑卒中与气候因素关系研究[J]. 重庆工商大学学报: 自然科学版, 2013, 30(3): 83 – 87.
- [7] 项正兵, 张昆南, 屈新辉, 等. 南昌市脑血管病发病与气象因素相关性研究[J]. 江西医药, 2013, 48(4): 283 – 285.
- [8] 殷冬琴. 气象因素对脑卒中发病率影响的灰色关联分析[J]. 甘肃联合大学学报: 自然科学版, 2013, 27(4): 18 – 21.
- [9] 曾进胜, 黄如训. 易卒中型肾血管性高血压大鼠模型及其应用[J]. 中山医科大学学报, 1996, 17(4): 241 – 244.
- [10] 施晓耕, 林健雯, 黄如训. 人工寒潮诱发肾血管性高血压大鼠脑中[J]. 实用预防医学, 2007, 14(4): 976 – 978.
- [11] 杨小慢, 陆德琴, 李贤, 等. 双肾双夹大鼠肾血管性高血压模型的制作[J]. 心脑血管病防治, 2009, 9(5): 341 – 346.
- [12] 王文靖, 潘毅, 杨涛. 两肾一夹型高血压大鼠模型的改良及评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 203 – 205.
- [13] 张奇, 吕圭源, 夏超群, 等. 长期高嘌呤饮食诱导高血压动物模型[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1): 159 – 162.
- [14] 黄国辉, 冯建芳, 石召锋, 等. 肾血管性高血压大鼠模型复制方法[J]. 河南科技大学学报, 2011, 29(4): 247 – 249.
- [15] 曹珊珊, 李瑞芳, 方伟, 等. 肾性高血压大鼠模型制作的改良方法[J]. 河南科技大学学报: 医学版, 2012, 28(3): 165 – 167.
- [16] 高红华. 急性脑卒中与初次血压水平[J]. 中外健康文摘·医药学刊, 2007, 4(12): 3.
- [17] 王维治, 罗祖名. 神经病学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 143 – 148.

(2014-03-10 收稿 责任编辑: 徐颖)

世界中联与世卫组织建立官方正式关系

2015 年 3 月 11 日下午, 世界中医药学会联合会(简称“世界中联”)在北京举办新闻发布会, 宣布与世界卫生组织(简称“世卫组织”)建立了官方正式关系。世卫组织驻华代表施贺德博士出席, 代表陈冯富珍总干事祝贺世界中联与世卫组织建立官方正式关系。

余靖主席介绍了与世卫组织建立官方正式关系的工作, 从 2005 年正式申请到与世卫组织建立官方正式关系历经十年。通过建立官方正式关系, 体现了世卫组织对中医药的重视, 有利于扩大中医药的国际影响, 有利于拓展世界中联参与国际活动的渠道。世卫组织是联合国系统内卫生问题的指导和协调机构。它负责对全球卫生事务提供领导, 拟定卫生研究议程, 制定规范和标准, 阐明以证据为基础的政策方案, 向各国提供技术支持, 以及监测和评估卫生趋势。

李振吉副主席兼秘书长回答了记者的提问, 重点解答了与世卫组织的合作工作, 表示世界中联将依托海内外理事和

专业委员会的专家团队力量, 按照《世界中联与世卫组织 2015 – 2017 合作计划》展开合作, 具体包括: 通过世界中联三级会议平台开展交流与合作, 分享经验, 支持《世卫组织传统医学战略(2014 – 2023)》的实施; 开展中医手法研究调研, 提交全球手法研究报告; 向世卫组织提交世界中联已发布中医药国际标准, 反馈相关研究结果, 支持世卫组织的标准和指南制定工作; 向世卫组织提交中医药发展的年度报告, 提供中医药有效性和安全性的研究证据, 与世卫组织合作进行中医药信息研究与分析。

出席发布会的还有中国国家中医药管理局国际合作司朱海东副司长, 新闻办欧阳波调研员, 民政部民间组织管理局涉外组织管理办公室罗军调研员, 世界中联副秘书长姜再增、黄建银、陈立新, 人民日报(海外版)、中国日报、中国中医药报、健康报、中国医药报、凤凰网中医频道、新浪中医、世界中医药网、中国国际广播电台、医药经济报、蓝海电视台、北京商报等 10 余家新闻媒体参加了新闻发布会。