

· 论著 ·

血肿内注射肝素对猪脑叶出血后血肿周围水肿的影响

张新江 王苇 殷小平 常丽英 徐广润 张苏明 姜亚平 方思羽

【摘要】目的 观察猪脑叶出血后血肿内注射肝素对血肿体积和周围水肿的影响。**方法** 将 13 只乳猪随机分为单纯出血组和肝素组,前组在右侧额叶内注射 2.5 ml 动脉全血;后组注射 2.3 ml 动脉全血后血肿腔内再次注射 0.2 ml (500 U) 肝素钠。通过 1.5 T MRI 设备,动态观察发病后 30~60 min 和 24 h T2* 加权成像(T2* WI)、液体衰减反转恢复快速自旋回波序列 (FLAIR) 成像、弥散加权成像 (DWI) 显示病灶(包括水肿和血肿)体积的变化,比较血肿周围组织和对侧半球组织表观弥散系数 (ADC) 值的差别,并观察其组织病理学变化。**结果** T2* WI 显示,单纯出血组 24 h 血肿体积较发病 1 h 内无明显变化 [(2.21±0.28)cm³ 比 (2.33±0.30)cm³, P>0.05], 而肝素组 T2* WI 显示 24 h 时的病灶明显大于 1 h 内 [(5.29±0.98)cm³ 比 (3.09±0.38)cm³, P<0.01]。24 h 时血肿增大的动物血肿周围水肿区以 ADC 值升高为主,但局部降低;血肿体积无变化者仅见灶周 ADC 值升高,无降低现象。组织病理学显示肝素组 24 h 时血肿体积为 (5.45±0.96)cm³, 明显大于单纯出血者的 (2.31±0.22)cm³ (P<0.05)。同时发病后 24 h FLAIR 成像和 DWI 均显示肝素组病灶体积较单纯出血组明显增加 (P<0.05 或 P<0.01)。**结论** 脑出血后血肿内注射肝素钠不仅不能减轻血肿周围组织的水肿程度,而且可导致进行性继续出血,24 h 时血肿增大,大量出血时血肿周围存在局部缺血性损害。

【关键词】 脑出血; 脑水肿; 磁共振成像; 猪; 肝素

Effects of injecting heparin into the center of hematoma on perihematoma edema and hematoma volume in pigs with intracerebral hemorrhage ZHANG Xin - jiang *, WANG Wei, YIN Xiao - ping, CHANG Li - ying, XU Guang - run, ZHANG Su - ming, JIANG Ya - ping, FANG Si - yu. * Department of Neurology, Yangzhou The First People's Hospital, Yangzhou 225001, Jiangsu, China

【Abstract】Objective To investigate the safety and effect of injecting heparin into hematoma on perihematoma edema and hematoma volume in pigs with intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** Thirteen sucking pigs were divided randomly into two groups: hemorrhage group, in which 2.5 ml arterial blood was injected into the right frontal lobe and heparin group, in which 0.2 ml of heparin was injected into the hematoma produced by the injection of 2.3 ml of blood into the similar site. The hematoma volume and perihematoma edema were determined by the sequences of T2* weighted image (T2* WI), fluid -attenuated inversion -recovery (FLAIR) image and diffusion weighted image (DWI) by 1.5 T magnetic resonance image (MRI) from 30 - 60 minutes afterwards to 24 hours. The perihematoma apparent diffusion coefficient (ADC) was compared with that of contralateral hemisphere, and the corresponding histologic changes were studied. **Results** The average volume, shown by T2* WI at 24 hours, was significantly larger than that at 30 - 60 minutes after hematoma formation in hemorrhagic group [(5.29±0.98)cm³ vs. (3.09±0.38)cm³, P<0.01]. But there was no significant change in hematoma volume in hemorrhagic group from 30 - 60 minutes on to 24 hours [(2.21±0.28)cm³ vs. (2.33±0.30)cm³, P>0.05]. Both increased and decreased ADC were found around the hematoma in some animals of the heparin group compared with that of the contralateral hemisphere. On the other hand, in hemorrhagic group, only increased ADC could be found around the lesion, and there was no decreased ADC. **Conclusion** Injection of heparin into an intracerebral hematoma leads to enlargement of the hematoma and more marked perilesion edema. On ADC maps, enlargement of hematoma is attributed to the edema around the lesion leading to injury to the brain tissue.

【Key words】 intracerebral hemorrhage; brain edema; magnetic resonance image; pig; heparin

基金项目:卫生部临床学科重点基金资助项目(97070241)

作者单位:225001 江苏省扬州市第一人民医院神经内科(张新江,王苇,殷小平);430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科(常丽英,张苏明,姜亚平,方思羽);山东大学齐鲁医院神经内科(徐广润)

通讯作者:张苏明

作者简介:张新江(1962-),男(汉族),陕西省蒲城县人,医学博士,主任医师,主要从事脑血管病的临床和实验研究,已发表论文 20 余篇。

脑出血后继发性血肿周围水肿是影响患者预后的主要原因之一。已知脑出血后血块收缩释放出的凝血酶等血清成分具有神经毒性作用,是血肿周围水肿的主要原因之一^[1],而肝素可能减轻凝血酶导致的脑水肿^[2]。因此有学者在进行脑出血血肿引流的过程中将肝素用作液化剂注入血肿内,但是对该方法的安全性以及是否可真正减轻脑水肿的程度尚缺乏对比观察。为此,本研究拟采用猪脑叶出血模

型,通过 1.5 T 磁共振成像(MRI)技术模拟临床过程,观察血肿内注入肝素后血肿和灶周水肿的变化,试图说明其安全性,为进一步的临床治疗提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 动物分组、模型制备及肝素的使用:体重 10~15 kg 乳猪 13 头,雌雄不拘,随机分为单纯出血组($n=7$)和肝素组($n=6$)。参考 Wagner 等^[3]的方法建立猪脑叶出血模型,但改为两次注射,即先注射 0.5 ml 不抗凝的动脉血,5 min 后再次抽取动脉血并注射,以减少血液由针道的反流。单纯出血组分两次向右侧额叶注射总量为 2.5 ml 的动脉全血,造成中等量脑叶出血模型;肝素组基本操作同单纯出血组,但在脑内注射不抗凝全血 2.3 ml 后 10 min,在不移动血肿内留置针的情况下,将用生理盐水稀释为 2.5×10^6 U/L 的肝素钠溶液 0.2 ml (500 U) 缓慢注入血肿内。

1.2 动态 MRI 方法

1.2.1 扫描序列和参数:模型制备成功后 30~60 min 将动物送入 1.5 T 磁共振(MR)设备中,用表面线圈(QUADKNEE)、层厚 4 mm、间距 1 mm 进行轴位扫描,距阵 256×256 。① T_2^* 加权成像(T_2^* WI)采用梯度回波(GRE)序列,重复时间(TR)=500 ms,回波时间(TE)=26 ms。② 液体衰减反转恢复快速自旋回波序列(fluid - attenuated inversion - recovery, FLAIR)成像,TR=8 002 ms,TE=133 ms。③ 弥散加权成像(diffusion weighted image, DWI)采用自旋回波-平面回波(SE - EPI)序列、FLAIR 成像,TR=10 000 ms,TE=90.5 ms,扩散梯度因子 $b=1\ 000$ s/mm²。在发病 24 h 时再次复查以上序列。

1.2.2 T_2^* WI、FLAIR 成像、DWI 显示病灶体积(包括血肿和灶周水肿)的计算:发病后用 Sigma 公司提供的 eFilm 软件,根据多田公式计算各个序列、不同时期的病灶体积。病灶体积(cm³)= $\pi \times$ 病灶最大层面的长轴 \times 短轴 \times 层数 \times 层厚 $\div 6$ 。

1.2.3 表观弥散系数(ADC)值计算:在 FLAIR 成像显示血肿周围信号最高的层面,取血肿周围 4 个感兴趣区,计算其平均 ADC 值。在 ADC Map 图上,如出现局部 ADC 值较对侧皮质降低和升高并存时,分别计算其 ADC 值。

1.3 病理观察和组织含水量测定

1.3.1 组织病理学观察:单纯出血组和肝素组动物于制模成功后 24 h 处死,以针道为中心,间隔 4 mm

切片、拍照,用 PIAS - 1000 型高清晰度多媒体图像分析系统(同济医科大学清平影像工程公司生产)计算血肿体积。取血肿周围额叶皮质和对侧半球相应部位的皮质,用体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定 24 h,常规方法进行石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。

1.3.2 组织干、湿重测定:于制模成功后 24 h 取血肿周围额叶皮质及对侧半球相应部位皮质组织少许,放入一个已称重的冻存管内,电子天平称湿重后放入 100 °C 烤箱内 24 h,再次称重,计算含水量。

$$\text{含水量}(\%) = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$$

1.4 统计学方法:用 SPSS 10.0 统计软件包对数据进行处理,计量资料组间比较采用方差分析和 t 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 T_2^* WI、FLAIR 成像、DWI 显示病灶(包括血肿和灶周病变)体积的动态变化(表 1,彩色插图 1~3): T_2^* WI 显示单纯出血组发病后 24 h 内血肿体积变化不明显,但肝素组发病后 24 h 时血肿较 1 h 内明显增大;FLAIR 成像和 DWI 均在 24 h 显示 2 组动物血肿周围有明显水肿。

表 1 两组 T_2^* WI、FLAIR 成像和 DWI 显示病灶体积的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of lesion volume proved by T_2^* WI, FLAIR and DWI between two groups($\bar{x} \pm s$) cm³

组别	时间	动物数(只)	T_2^* WI	FLAIR 成像	DWI
单纯出血组	36~60 min	7	2.33 \pm 0.30	3.57 \pm 0.21*	3.29 \pm 0.21*
	24 h	7	2.21 \pm 0.28	5.01 \pm 0.44	4.51 \pm 0.39
肝素组	30~60 min	6	3.09 \pm 0.38*	2.31 \pm 0.27**	2.40 \pm 0.33**
	24 h	6	5.29 \pm 0.98 $\Delta\Delta$	7.10 \pm 0.94 Δ	6.09 \pm 0.71 Δ

注:与本组 24 h 比较;* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与单纯出血组相应时间点比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 脑出血后 24 h 灶周组织 ADC 值的动态变化:肝素组中有 3 只动物发病后 24 h 见局部 ADC 降低〔灶周组织(68.1 \pm 10.7) $\times 10^5$ mm²/s,对侧组织(85.2 \pm 11.3) $\times 10^5$ mm²/s, $P < 0.01$,见彩色插图 4),并存在出血量明显增加、脑水肿也更加广泛和严重的现象(彩色插图 3);而该组中所有动物均见灶周组织的广大区域 ADC 值升高〔病灶侧组织(135.1 \pm 13.0) $\times 10^5$ mm²/s,对侧组织(85.2 \pm 11.3) $\times 10^5$ mm²/s, $P < 0.01$ 〕。单纯出血组可见灶周水肿区 ADC 值升高〔灶周组织(126.9 \pm 16.5) $\times 10^5$ mm²/s,对侧组织(81.4 \pm 7.6) $\times 10^5$ mm²/s, $P < 0.01$ 〕,未发现 ADC 值降低现象。

2.3 组织病理学观察:单纯出血组 24 h 血肿呈不

规则形状,沿额叶脑回的白质分布,体积为(2.31±0.22)cm³;肝素组血肿体积为(5.45±0.96)cm³,明显大于前者($P<0.01$);其中 4 只动物的血肿呈规则球形,皮质明显受压,血肿由两部分组成,中心区为凝固血液,周围可见不凝固血液,部分动物可见蛛网膜下腔积血;另 2 只动物血肿增大不明显。两组 24 h 光镜下均可见血肿周围组织高度肿胀,大量中性粒细胞浸润,部分神经细胞变性、坏死,血管周围可见大量吞噬细胞。两组对侧皮质变化不明显。

2.4 灶周组织含水量(表 2):制模后 24 h 单纯出血组、肝素组灶周组织含水量较各自的对侧组织均明显增加(P 均 <0.01),两组灶周组织含水量比较差异无显著性($P>0.05$)。

表 2 两组灶周组织含水量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of water content around perihematoma between two groups($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	灶周组织含水量(%)	对侧组织含水量(%)
单纯出血组	7	83.47±1.37	77.66±0.71*
肝素组	6	85.22±5.20	79.18±4.09*

注:与灶周组织比较;* $P<0.01$

3 讨论

近年来动物实验研究证实了脑出血后血液凝固释放出的血清成分具有神经毒性作用^[1,2]。心肌梗死患者溶栓治疗并发脑出血时虽然血肿较大,但脑水肿并不严重^[4],推测其原因与血液不凝固、不产生大量凝血酶有关。为此,寻找能够拮抗凝血酶作用的药物以减轻脑出血时脑水肿的严重程度极其重要。水蛭素具有特异性拮抗凝血酶的作用,但国内无药物供注射使用。有学者将肝素注入血肿内试图减轻脑水肿和融化凝固的血块^[5],但对该方法的安全性以及效果尚缺乏大样本及深入的研究,因此有必要采用理想的动物模型和先进的设备进行在体研究。

本实验中通过动态 MRI 证实,脑出血后血肿腔内注射肝素钠可导致部分动物血肿量进行性增加,24 h 血肿较发病初期几乎增加 1 倍,同时 FLAIR 成像发现灶周水肿范围较大。病理观察与 MRI 显示一致,新鲜标本上血肿由两部分组成,中心区为暗红色凝固血液;周围可见鲜红色不凝固血液,为新鲜出血。因此推测肝素可通过激活抗凝血酶 III,作用于多种凝血因子,使血肿内受损的小血管持续出血,导致进行性血肿增大。关于脑出血后血肿周围水肿的性质,即是否存在缺血性损害仍存在争议^[2,6,7],但以往的研究忽视了出血量对脑水肿性质的影响。DWI 通过观察组织中 ADC 值对组织中水的性质作出判

断即是自由扩散的水分子,还是受生物膜限制、与大分子结合的水分子,已用于急性脑梗死的研究^[8]。本研究发现,肝素组动物在发病后 24 h 血肿周围仍以 ADC 值升高为主,仅在部分并发大量出血的动物可看到局部较小范围的 ADC 值降低,提示可能有缺血性损害;而单纯出血组及肝素组中血肿量无增加者仅见局部 ADC 值升高。显然这种缺血性损害是大量出血的结果,与此时颅内压升高有关,并非肝素的直接作用。国外报道了 1 例大量出血(80 ml)的患者局部 ADC 值降低,提示颅内压增高可造成局部严重低灌注状态而发生缺血性损害^[9]。曾有作者将肝素钠抗凝的动脉血注射至大鼠脑内,由于不发生凝血过程,无凝血酶生成,因此脑水肿较轻^[6],这与本实验过程中已经发生血液凝固、大量凝血酶生成、脑水肿较严重的结果并不矛盾。

总之,本研究中通过在体动态 MRI 观察发现,血肿内注射肝素并不能减轻 24 h 时脑水肿的严重程度,相反,可引起血肿进行性增大,导致局部脑缺血,造成颅内压增高等不良后果,因此肝素可否作为血肿液化剂在脑出血微创血肿引流术中安全使用尚需进一步研究验证。由于肝素无直接或间接激活纤溶酶、降解纤维蛋白的作用,对已发生凝固的血块无作用,故从理论上分析肝素治疗脑血肿无积极意义。

参考文献:

- 1 张新江,易黎,常丽英,等.凝血酶神经毒性作用的在体磁共振观察[J].中国急救医学,2004,24:7-9.
- 2 张新江,方思羽,张苏明.对脑出血周围组织存在缺血性损害的再认识[J].国外医学脑血管病分册,2001,9:168.
- 3 Wagner K R, Xi G, Hua Y, et al. Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs: rapid edema development in perihematomal white matter[J]. Stroke, 1996, 27: 490-497.
- 4 Gebel J M, Brott T G, Sila C A, et al. Decreased perihematomal edema in thrombolysis-related intracerebral hemorrhage compared with spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. Stroke, 2000, 31: 596-600.
- 5 钟长明,金红阳,刘庆芳,等.微创血肿清除术救治脑出血并脑疝疗效观察[J].中国危重病急救医学,2002,14:177-178.
- 6 Xi G H, Wagner K R, Keep R F, et al. Role of blood clot formation on early edema development after experimental intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 1998, 29: 2586-2590.
- 7 Qureshi A I, Wilson D A, Hanley D F, et al. No evidence for an ischemic penumbra in massive experimental intracerebral hemorrhage[J]. Neurology, 1999, 52: 266-272.
- 8 易黎,张苏明,张新江,等.大鼠局灶性脑缺血及再灌注磁共振弥散加权成像的早期动态观察[J].中华心脑血管病杂志,2001,3: 193-196.
- 9 Carhuapoma J R, Wang P Y, Beauchamp N J, et al. Diffusion-weighted MRI and proton MR spectroscopic imaging in the study of secondary neuronal injury after intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2000, 31: 724-726.

(收稿日期:2004-04-06 修回日期:2005-03-03)

(本文编辑:郭方)

严重烧伤早期肠黏膜组织热休克蛋白70的表达规律

(正文见264页)



图4 正常大鼠肠黏膜组织未见HSP70的表达 (免疫组化 ×200)
Figure 4 Expression and contribution of HSP 70 in intestinal mucosa in control (immunohistochemistry, ×200)



图5 大鼠烫伤后12 h肠黏膜组织HSP70的表达与分布 (免疫组化, ×200)
Figure 5 Expression and contribution of HSP 70 in intestinal mucosa at 12 hours postburn (immunohistochemistry, ×200)

血肿内注射肝素对猪脑叶出血后血肿周围水肿的影响

(正文见276页)

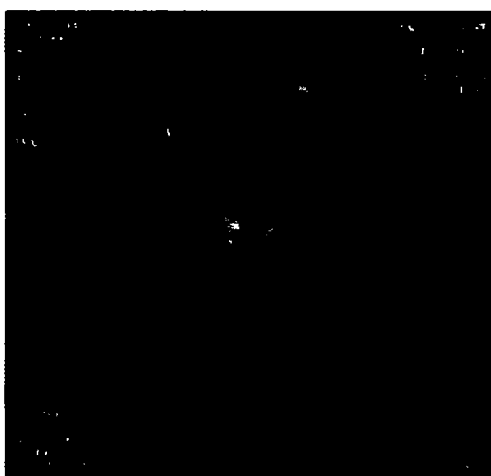


图1 肝素组血肿内注射肝素60 min后T2*WI显示病灶
Figure 1 Lesion shown on T2*WI at 60 minutes after injecting 500 U heparin into the center of hematoma in heparin group



图2 肝素组血肿内注射肝素24 h后T2*WI显示病灶
Figure 2 Lesion shown on T2*WI at 24 hours after ICH in heparin group

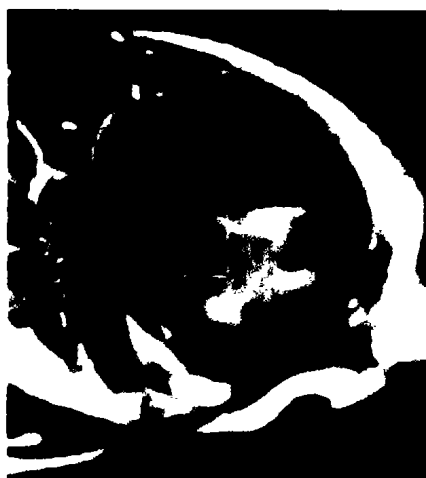


图3 肝素组24 h FLAIR序列显示灶周水肿
Figure 3 Perilesion edema shown on FLAIR at 24 hours after ICH in heparin group



图4 肝素组24 h ADC Map 灶周向部ADC值升高 (红色) 与降低 (绿色) 并存
Figure 4 ADC map on 24 hours after ICH showing increased (red) and decreased (green) around hematoma in heparin group

hll