

家兔脑基底动脉离体制备动脉环与张力记录方法的改进及应用价值

柯庆¹, 胡必利¹, 朱炳阳², 李良¹, 周太国¹, 廖端芳²

(南华大学基础医学院 1. 生理学教研室, 2. 药理学教研室; 湖南省衡阳市 421001)

[主题词] 脑基底动脉; 离体灌流/方法学

[摘要] 为了更好地研究脑血管药物的作用机制, 对家兔脑基底动脉离体制备动脉环和记录张力变化的方法进行了改进。主要有三个方面: ①急性放血, 从颅顶开颅快速取出脑基底动脉; ②在冷光源下, 将已离体的脑基底动脉悬浮于预冷灌流液中, 再行制备动脉环和进行记录前的各项操作; ③利用 BL-310 微机型生物机能实验系统记录脑基底动脉环在药物作用下的张力变化。结果发现, BL-310 微机型生物机能实验系统的精密性、准确度和精确度都比二道生理记录仪高; 制备的家兔脑基底动脉环标本在 KCl、苯福林和组胺等药物作用下张力变化明显, 用 BL-310 系统能真实地记录到这些张力变化。此结果说明, 改进的家兔脑基底动脉离体制备动脉环灌流和记录张力的方法更适用于小动脉生理、病理生理和药理的实验研究。

[中图分类号] R331.32

[文献标识码] A

脑基底动脉(basilaris arteria, BA)离体灌流法是研究脑血管的生理、病理及药理的方法之一^[1-5]。家兔脑基底动脉直径仅 0.3 mm 左右, 与颅外同类小动脉比较, 壁较薄, 平滑肌仅 1~2 层, 血管张力变化较小。这就使家兔 BA 离体及记录张力变化的操作难度大, 时间长, 影响了 BA 离体灌流实验的广泛应用。为此, 本室针对以上问题和本实验室现有条件, 在文献[6]报道方法的基础上, 进行了改进, 使其更适合于一般实验室应用, 现予报道。

1 材料与方法

1.1 设备、器械和试剂

BL-310 生物机能实验系统(成都泰盟电子有限公司 1998 年生产), JH-2B 型张力传感器(北京航天医学工程研究所), 直径 100~120 μ m 银丝, 000 号细线, KCl, 苯福林(phenylephrine, Phe, 上海天丰药厂), 氯化乙酰胆碱(acetylcholine, ACh, 上海试剂三厂), 磷酸组胺(histamine diphosphate monohydrate, His, 上海生物化学研究所东风生物化学技术公司), 甲基莲心碱(neferine, Nef, 安徽宣州 DELTA 天然有机化合物信息中心)。

[基金项目] 湖南中医药局科研基金(重点 2000006)

[作者简介] 柯庆, 女, 1955 年 10 月出生, 广东省丰顺人, 临床医学本科毕业, 生理学副教授, 南华大学基础医学院生理学教研室主任。胡必利, 男, 1948 年 11 月出生, 湖南省祁东县人, 生理学副教授。廖端芳, 男, 1962 年出生, 药理学教授, 本文通讯作者。

1.2 实验准备

首先配制 Krebs-Henseleit(K-H)液。然后测定 BL-310 生物机能实验系统(简称 BL-310)的精密性、准确度和精确度, 并与二道生理记录仪(LMS-2B 型, 成都仪器厂, 简称二道仪)进行比较。

1.3 动脉环的制备

大耳白兔, 体重 2.5 ± 0.2 kg 左右, 背位固定, 行颈正中切开术后, 剪断双侧颈总动脉快速放血, 转为腹位, 迅速剪去头颈部皮肤和肌肉。用咬骨钳或大持针器从枕骨大孔向上和向下咬去颈椎和颅骨, 暴露脑和颈髓, 用干净眼科镊提起脑的前额部, 一边暴露脑底部, 一边用小眼科剪剪去颅底部与脑和颈髓相连的神经和血管, 直到椎动脉与基底动脉相连的部位为止。并在该处将脑和颈髓与其他颈髓部分离断, 并迅速移至预冷的 K-H 液中分离出基底动脉, 剪成 3~4 mm 长的动脉环, 轻轻漂洗去动脉环内的血液, 再放入盛有预冷的 K-H 液的培养皿中。

1.4 动脉环的固定、平衡及张力记录

在冷光源照射和实体显微镜下, 用修表镊张开动脉环一端的开口, 将 2 根头端光滑的银丝分别轻轻插入动脉内。若需去掉血管内皮, 则将 2 根头端一小段粗糙的银丝分别轻轻插入动脉内, 稍微滚动以去内皮(本实验血管去掉了内皮)。将两根银丝折成底部与血管环等长的对称等腰三角形, 在三角形的顶部各系一根细线, 线的另一端分别固定于张力换能器和盛有 10 mL K-H 液的浴槽底部小钩上。

以7号输液针缓慢通以小量氧气(气泡不连续, 20~30个/min), 内槽恒温37℃左右。由张力换能器得到的张力信号输入BL-310微机, 采用单点测量数据方式记录动脉环张力变化。定动脉环前负荷为400 mg, 动脉环在平衡液中平衡120 min, 其中每隔15 min换液一次。然后观察药物对动脉环张力的影响。

1.5 给药方法

将药物分为两组进行实验: 第一组加入80 mmol/L KCl溶液0.1 mL, 出现最大收缩反应后, 换液洗去KCl后平衡45 min, 再换液后平衡5 min, 依次加入 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L 苯福林各0.1 mL, 直至出现最大收缩反应时, 直接加入 10^{-8} 、 10^{-7} 和 10^{-6} mol/L ACh各0.1 mL, 观察血管的最大舒张反应。第二组先加入 10^{-5} 、 10^{-4} 和 10^{-3} mol/L 磷酸组胺各0.1 mL, 待出现最大收缩反应时直接加入 10^{-5} 、 10^{-4} 和 10^{-3} mol/L 甲基莲心碱各0.1 mL, 观察血管最大舒张反应。在进行上述实验时, 始终以生理盐水作为空白对照。

1.6 统计学方法

以变异系数(CV)、偏差系数(CB)和分析系数(CA)来评价两仪器的精密度、准确度和精确度。药物作用后血管的张力反应以最大幅度的一次为准, 其数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计; 并用配对 t 检验来判断差异是否有显著性意义。

2 结果

2.1 仪器的校正

将BL-310生物机能实验系统和二道生理记录仪先后连接同一个张力换能器, 分别测定200 mg标准砝码, 对得到的结果进行统计后如表1所示。说明BL-310生物机能实验系统的精密度、准确度和精确度优于二道生理记录仪, 完全可用于机能实验。

表1 BL-310和二道生理记录仪的精密度、准确度和精确度的比较(%)

仪器	CV	CB	CA
二道仪	0	98	1
BL-310	0	25	75

注: CV为变异系数, CB为偏差系数, CA为分析系数。

2.2 药物引起脑基底动脉环张力的变化

用制备的脑基底动脉环标本来观察药物的作用, 发现用药前后离体家兔脑基底动脉环张力变化

明显(表2和表3), 说明制备的脑基底动脉环标本反应灵敏。

表2 KCl、苯福林和乙酰胆碱引起离体家兔脑基底动脉环张力的变化(mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	用药前	用药后
对照	10	6±10	6±10
KCl	10	300±40	360±5 ^a
苯福林	10	300±60	340±50 ^a
乙酰胆碱	10	330±60	320±60

a: 与对照组和自身用药前比较, $P < 0.001$ 。

表3 磷酸组胺和甲基莲心碱引起离体家兔脑基底动脉环张力的变化(mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	用药前	用药后
对照	10	290±30	280±30
磷酸组胺	10	280±20	700±50 ^a
甲基莲心碱	10	690±30	690±50

a: 与对照组和自身用药前比较, $P < 0.001$ 。

3 讨论

家兔脑基底动脉环在脑血管药物的作用机制研究中有广泛的应用前景。然而, 由于制备家兔脑基底动脉环标本的难度较大, 标本收缩时张力变化较小, 对记录仪器灵敏度的要求较高, 在以往实验研究中的应用受到了限制^[1~5]。针对上述情况, 本文在文献[6]报道的基础上, 对家兔脑基底动脉离体制备动脉环和张力记录的方法进行了改进, 主要有三个方面: ①急性放血, 从颅顶开颅快速取出BA; ②在冷光源下, 将已离体的BA悬浮于预冷灌流液中, 再行制备动脉环和进行记录前的各项操作; ③利用BL-310微型生物机能实验系统记录BA环在药物作用下的张力变化。

实验中发现, 与二道生理记录仪相比较, BL-310微型生物机能实验系统的精密度、准确度和精确度都有了提高。因为二道仪只能用肉眼读数到0.1, 小数点后的第二位数是估计值; 而BL-310系统是电脑计数, 可准确读数到0.01, 这说明后者的精密度比二道仪高。对200 mg法码的测定结果中, BL-310系统的偏差系数(CB)比二道仪小得多, 说明BL-310系统的准确度比二道仪要大, 也就是说, BL-310系统测定的数据更接近真实数据。精确度是一个将精密度和准确度综合考虑的指标, 用分析系数来衡量。实验中发现, BL-310系统的分析系数比二道仪大得多, 说明BL-310系统的精确度比

二道仪要大,系统误差小。综上所述,BL- 310 系统更适合测定小动脉微小张力的变化。

实验中还发现,KCl、Phe 和 His 都能使制备的家兔脑基底动脉环产生收缩反应,用 BL- 310 系统记录到的张力变化十分明显,与文献[3, 4, 6]报道的结果一致。说明用本文改进的家兔脑基底动脉环灌流和记录方法做脑血管药物的作用机制和其它脑血管研究能获得满意的结果。这一方法有着广泛的应用前景。

参考文献

[1] Faraci FM, Brain JE. Nitric oxide and the cerebral circulation [J].

Stroke, 1994, **25**: 692

[2] Iadecola C, et al. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1994, **14**: 175

[3] 曾贵云. 钙拮抗剂对脑血管病的预防和治疗作用 [M]. 见:陈维洲,葛耀诚主编. 脑血管疾病基础与临床. 济南:山东科学技术出版社, 1993; 176- 186

[4] 曾贵云. 脑循环调节和影响脑循环药物 [M]. 见:陈修主编. 心血管药理学. 北京:人民卫生出版社, 1989; 85

[5] Steinke DE. A trial of the 21- aminosteroid U74006F on a primate model of chronic cerebral vasospasm [J]. *Neurosurgery*. 1989. **24**: 179

[6] 万有. 离体家兔肺动脉和脑基底动脉环实验方法 [M]. 现代医学实验方法. 北京:人民卫生出版社, 1998; 997

(此文 2000- 12- 10 收到, 2001- 03- 10 修回)

(此文编辑 朱雯霞)

·消 息·

第六届全国脂蛋白与动脉粥样硬化学术会议征稿通知(第一轮)

中国生物化学与分子生物学会脂蛋白专业委员会与中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会拟定于 2001 年 7 月在山东烟台或威海市联合举办第六届全国脂蛋白与动脉粥样硬化学术会议,现将有关征稿事宜通知如下:

1 征稿内容

自 1998 年第五届全国脂蛋白与动脉粥样硬化学术会议(杭州)以来有关脂蛋白与动脉粥样硬化发病机理的基础与临床研究的论文或综述等。

2 稿件要求

论文摘要 500~ 800 字,综述 3000 字左右,按《中国动脉硬化杂志》格式编排。请用 A₄ 纸打印,题目用 4 号黑体字,正文用 5 号宋体字,用“Word 97”存盘,将磁盘一并寄来。也可用电子邮件方式投稿,电子邮件信箱: shenghua@sdmu.edu.cn 或 blsl@sdmu.edu.cn。

3 征稿时间

即日起至 2001 年 3 月 30 日止。

4 来稿地址

山东省济南市文化西路 44 号山东大学西校区(原山东医科大学)生物化学教研室姜安丽老师收或病理生理学教研室陈融老师收。邮编 250012,电话 0531- 2942092。

会议将安排国内专家进行专题讲座,将争取邀请国内著名学者讲学。会议期间动脉粥样硬化专业委员会将进行换届工作,望各位委员一定参加

第六届全国脂蛋白与动脉粥样硬化学术会议筹备组
2001 年 03 月