

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

計劃編號	NSC 89-2314-B-002-181	
計劃名稱	實驗性蜘蛛膜下腔出血後腦血管攣縮所引起之細胞凋亡 第一部份：電子及光學顯微鏡檢下之細胞凋亡變化 Apoptosis induced by cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. Part: Apoptotic change under electron and light microscopic examination.	
執行期限	民國 88 年 8 月 1 日 至 民國 89 年 12 月 31 日	
主持人	杜永光	
執行機構及單位名稱	台大醫學院外科	

蜘蛛膜下腔出血，腦血管攣縮，細胞凋亡

蜘蛛膜下腔出血所引起的腦血管攣縮，是神經外科常遇見而預後非常不好的一種疾病。目前，對於其致病機轉，不是非常瞭解，而在臨床治療上，也因而缺乏良好的方法。

細胞凋亡，或稱程式化之細胞死亡，是由基因來控制整個凋亡變化的進行過程。此種變化常見於神經系統的各種病理變化之中。目前，有關腦缺血變化所引起的細胞凋亡的研究，在近年來有了不少的報告。然而，腦血管攣縮與細胞凋亡之關係，則鮮少有人做這一方面的研究。

在本研究的第一年計劃中，我們擬以目前研究細胞凋亡較可靠的組織形態學的方法，去研究此一題目。實驗中先在大白兔顱內，以二次蜘蛛膜下腔出血的模式，造成腦部基底動脈之攣縮，並以血管攝影證實及測量其攣縮之程度。經7天後，犧牲動物，再以特殊染色法，以光學顯微鏡檢及電子顯微鏡檢，去尋找腦組織及腦血管壁內細胞凋亡產生之證據。

如果，我們初步的實驗成功，我們也計劃在後續的實驗中，以分子生物學的方法，再度去查證腦血管攣縮與細胞凋亡之關係。其次，我們也計劃去尋找有關血管攣縮之細胞凋亡之調節基因，以瞭解可能引發及抑制腦血管攣縮後細胞凋亡之基因，及其作用機轉。希望能使基因療法成為將來治療腦血管攣縮的一個可行的方法。

一、腦血管攣縮

顱內動脈瘤破裂後，所引發的蛛網膜下腔出血(Subarachnoid Hemorrhage, SAH)是一個常見而預後相當不好的疾病。雖然我國尚未有全國性的統計數字，但依據美國衛生部的統計，每年自發性(非外傷性)的蜘蛛膜下腔出血，全美約有三萬個病例(1)。如果依人口比例計算，我國每年的病例應在三千例左右。雖然，這個數字在腦中風的病人中，只佔了6%-7%，但其死亡率與發病後引起的後遺症，仍居各種不同的中風型態中之冠。近年來，儘管各種檢查儀器、手術方式、及手術前後的照顧等方面，皆有了長足的發展。但是，SAH的預後還是相當的不理想。依據Ingall等人的統計指出，SAH的死亡率在25%-30%間，而倖存的病人中仍有50%留下嚴重的後遺症。(2)

影響SAH之臨床變化及造成預後不佳的原因有三：第一是，動脈瘤的再破裂；第二是SAH後腦血管攣縮(cerebral vasospasm)的形成；第三是，SAH後急性或慢性水腦的產生。其中又以前二者的影響較為重要。

以上二個問題的生成及預防，以第一個問題答案較為簡單。再破裂是由於血管內壓上升及覆蓋於動脈瘤上的血塊溶解所致。病人血壓的控制及抗纖維素分解劑(antifibrinolytic agent)的施予，可減少再破裂的機會，但是根本之道則在於早期手術，將動脈瘤夾紮，或以血管內栓塞術塞住動脈瘤。至於腦血管攣縮的問題，則較麻煩。由於其生成的真正原因至今尚未完全明瞭，所以治療的方針也不易確定。一般認為血管攣縮是蛛網膜下腔的血塊分解後的產物。對血管壁所產生的一種炎症反應或免疫反應(3)。所以在治療上，除了升血壓及血液稀釋改善腦血流量外；也有人以鈣離子拮抗劑促使血管壁的肌肉層放鬆；以自由基清除劑預止次發性的腦缺血變化之擴散，或以抗炎劑或免疫劑來減少血管攣縮的生成，來做為治療的一種嘗試(3)。但是，在其基本的作用機轉尚未完全明瞭的情形下，並無一確實而有效的療方。

二、細胞凋亡

細胞凋亡(apoptosis)或稱程式化之細胞死亡(programmed cell death)，有別於一般的細胞壞死(necrosis)，是由基因來控制其整個過程之進行(4-10)。細胞凋亡廣泛的存在於各種器官組織的生理或病理變化之中。在正常的生理變化中，不論是在增生快或慢的組織中，皆存在此種變化(11)。所以在個體的生長與分化中伴演著一個重要的角色。此外，在體內產生某些免疫的反應中(12)或內分泌的改變時(13)，也有此變化生成。

在病理的情況下,細胞凋亡也發生在很多疾病之中。一般認為細胞凋亡的步驟失調是造成癌症、後天免疫缺乏症等問題的主因(14)。而細胞凋亡最常見於神經系統的各种病理變化之中。例如神經退化性疾病、腦及脊髓的缺氧缺血變化，及神經中毒或溫度傷害等病理變化(15)。所以，目前對細胞凋亡的研究，成為近年來要瞭解各項神經系統疾病致病機轉，甚至尋求其有效治療方法的重要研究方針。

1.細胞凋亡的形態學研究

在所有的對神經系統有關細胞凋亡的研究當中，最引起現今學者注意的是有關腦缺氧缺血變化時所導致的細胞凋亡的研究。在形態學的研究上發現在腦缺血後，細胞凋亡的變化，最早顯現就是胞內的染色體結集成濃染的結塊(16)，而細胞核也失去其完整性(17)，至於細胞質本身則呈濃縮狀，但是細胞膜則仍呈其完整性(17)。細胞質中也會出現空泡(16)。別外，一個重要的發現則是粒腺體不會有變化(8, 11)。其較晚期的變化，則可發現有所謂的apoptotic body在細胞質內形成(5,14)。這些形態學上的變化皆有別於一般的細胞壞死。此種變化在不同的組織內產生的時間不同；在腦部變化，一般在一至七天內完成(17)。目前的研究，雖然發現在細胞凋亡的過程中，有很多分子生物學的變化，但是要偵測細胞凋亡的生成還是以這些形態學上的變化為最可靠。

2.細胞凋亡的分子生物學研究

至於分子生物學在細胞凋亡時的變化，主要的是因為其DNA的分裂，而造成很基因的產物。目前大多以agarose gel電泳法，分析這些細胞核內DNA分裂之產物來證實(13)。於細胞核中這些DNA分解後的碎片的存在，代表細胞凋亡的進行，而此種發現也可與細胞壞死時，DNA的溶解作一個區別。然而，這樣的分析，在單一細胞株的培養中，較易確定。但是在活體的神經系統之中，由於有著各種分化程度的神經元與膠質細胞。這種不純一性(heterogeneity)的細胞系統，再加上組織傷害後，白血球因炎症反應而進入組織之內，會再引發其他的細胞凋亡反應，更使得其不純一性上升，使得活體內的分子生物學分析結果不可靠(14)。所以目前對細胞凋亡之研究仍以形態學的分析較準。

另外DNA的碎片也可以在細胞內以DNA polymerase或terminal deoxynucleotidyl transferase (15, 18) 去催化deoxyuridine triphosphate之轉化，來作為in situ 之偵測。這些方法，前者稱為 in situ nick translation 法，而後者則稱為 terminal transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)法(15, 19)。這二種方法，在分辨內含有DNA之碎片之細胞皆很可靠。但是其缺點為：無法分辨經labeling出之DNA碎片。是代表著細胞凋亡之末期，或細胞復原時DNA之修補過程(18-20)。

3.細胞凋亡與其調節基因

在細胞凋亡之發生時，存在著調節基因(regulating gene)。最常見的調節基因為Cystine protease 或稱Caspases，目前已知的約有10種(21, 22, 28, 29)。另一常見的調節基因為 bcl-2 protoon-cogene。在這一族的調節基因中有一些為抗細胞凋亡(antiapoptotic) 之作用 (如 bcl-2, bcl-x_L, 及 mcl-1 等)(26)，另一些則為促細胞凋亡(proapoptotic) 之作用(如 bax, bcl-x_S, bak及bik等)(21, 22)。以上這些蛋白質成分的基因之分解或結合，主宰著細胞存活或死亡之命運。

除了以上這些蛋白質外，由粒腺體膜所釋出的Cytochrome C 也在細胞凋亡的過程中扮演了另一個重要的角色(23, 24)。

在cytosolic ATP 及deoxyadenosine triphosphate存在下，cytochrome C 可以活化Caspase(23)，而caspase則活化DNAase，造成細胞核內之genomic DNA分段，最後引發細胞凋亡之過程。而抗細胞凋亡基因(如bcl-2，bcl-x_L)則可阻止cytochrome C 由粒腺體膜上釋出，而可防止細胞凋亡過程的引發或擴大(25)。

三、細胞凋亡與腦血管攣縮

有關以上細胞凋亡在腦缺血時的變化及作用機轉，在最近的五至十年來，成為一熱門的研究題材。有關的報告，特別是近五年來，大量的湧現(16, 17, 28-37)。但是，細胞凋亡在蜘蛛膜出血後的存在與其變化的研究，則付之闕如。直至去年，Hara等人所發表的研究指出：在動脈瘤病人的解剖標本上，發現在顱內動脈瘤及附近之主要血管細胞核內，有DNA碎片的存在(27)。但是這個變化到底代表著細胞凋亡是動脈瘤生成的原因，或腦血管攣縮過程中有細胞凋亡的存在，則無法證實。

在本研究計劃中，我們擬以兔子的二次蜘蛛膜下腔出血的腦血管攣縮模型。研究以下兩個與細胞凋亡有關的方向：(一)研究在腦血管攣縮後，因血流減少所引起的腦缺血變化而造成的腦部細胞凋亡的變化。而此一部份研究的焦點，特別注意於與基底動脈灌流有關的腦幹及其他的後循環灌流區的腦組織。(二)研究基底動脈及其分枝本身的管壁，在血管攣縮形成後，是否也有細胞凋亡的變化存在。

在第一年的計劃中我們擬先以光學顯微鏡檢及電子顯微鏡檢，研究細胞凋亡在腦血管攣縮後形態學上的存在證據。如果獲得正面的結果，在後續的研究中，我們也擬以TUNEL法，尋找腦血管攣縮時存在著細胞凋亡之分子生物學證據。最後，我們也擬以相同的動物模型，研究其抗細胞凋亡及促細胞凋亡等調節基因，以尋找將來可能的腦血管攣縮的基因療法。

一、實驗大綱

本實驗擬使用年齡在20至24週左右，體重約3.5-4kgw的雄性New Zealand大白兔60隻。其中40隻白兔為實驗組，另外20隻則施以Sham operation作為對照組。

實驗組的白兔以「二次出血模式」(Two bleeding model)(39)造成腦部的基底動脈血管攣縮，其後以血管攝影證實血管攣縮形成，並測其攣縮之程度。

所有實驗組及對照組之動物，於二次出血後七天犧牲。取其腦組織及基底動脈(及其分枝)，分成兩組在光學顯微鏡及電子顯微鏡下以特殊染色法，檢驗其細胞凋亡證據之存在，並比較實驗組與對照組之腦組織及腦血管壁上，有細胞凋亡證據之細胞數之差異。同時，分析其細胞凋亡數之多寡與腦血管攣縮程度之相關性。

二、腦血管攣縮之生成

大白兔以3.5%之halothane進行麻醉，而以N₂O及O₂維持。體表以熱水墊保溫，使肛溫維持在37°C左右。

為進行基底動脈之腦血管攝影，首先於頸部正中線近胸骨處切開，分離出兩側的鎖骨下動脈及脊椎動脈。由於基底動脈的血流由兩側脊椎動脈合流而來，為避免在一側注入顯影劑時被另一側血流沖淡，使兔子細小的基底動脈在血管攝影上，因而無法看到管壁邊緣，進而造成對血管攣縮程度判斷的困難。所以，在進行血管攝影之前，必須先找出左側脊椎動脈並予以結紮，以避免以上的困難發生。同時，在兔子的右側鎖骨下動脈插入一PE-50細管，將之導入右側脊椎動脈，以作為實驗前後進行基底動脈血管攝影之用。此導管之末端連以三叉接頭固定後，以heparine沖洗並植入皮下。如此，可反覆取出打入顯影劑以利進行多次的血管攝影。另外也可避免導管滑出或為兔子咬扯。

在完成左側脊椎動脈結紮及右側之導管植入後，將兔子反轉成俯臥。再以一25號之蝶形頭皮針插入其枕骨及頸椎間之大枕孔池(Cisterna Magnum)，抽出約2ml之腦脊髓

液後，再打入同量的抽自於脊椎動脈導管的動脈血。在將動脈血打入大枕孔池後，將兔子呈頭下腳上45度角之姿式維持30-60分鐘。此一步驟可使打入的血液，聚集在腦部近基底動脈處而促使腦血管攣縮的形成。前述過程經24小時後，再重覆一次，此即所謂Two bleeding model。使用此模型的理由為：動物在一次於蜘蛛膜下腔，打入足以引起其腦血管攣縮之血液之量時，可能因其顱內壓及其他的生理變化過劇，容易造成猝死。因此，分二次以較小之出血量進行則可避免之；同時亦可造成有意義的腦血管攣縮變化。

在對照組之兔子，所有之準備完全相同，但是在抽出腦脊髓液後再將其打回，此即所謂之sham operation

三、腦血管攝影及腦血管攣縮程度之測定

在完成脊椎動脈導管置入後，將顯影劑 urographin 3ml 由此處打入，並以X光機作攝影。攝得之X光片經放大後，於片箱上測量基底動脈之直徑。測量點選取基底動脈上、下兩端(A、B)及中間最狹窄處(C)之點。而最狹窄處的血管管徑除以上下兩端血管管徑的平均值，以其百分比作為腦血管攣縮的程度，亦即

$$\% \text{ of vasospasm} = \{1 - [C/(A+B)/2]\} \times 100\%$$

在完成第一次之血管攝影後，隨即進行二次的蜘蛛膜下腔之動脈血注射，引發基底動脈攣縮。第二次的血管攝影以相同方法進行。進行時間在蜘蛛膜下打入動脈血後七天，亦即血管攣縮之情形最厲害時進行。

以上進行血管攝影時，X光機離片匣的距離，及X光片放大的倍數皆以固定值進行。每隻兔子在進行第一次的攝影時，以膠布標出鼻尖及兩側顎骨彎的位置，以便於第二次攝影時也可置於相同之位置，而減少攝影的誤差。

四、光學顯微鏡之檢查

在進行完兩次血管攝影後，亦即是在蜘蛛膜下腔出血之第七天後，犧牲兔子。所有的實驗動物分出一半(實驗組廿隻，對照組十隻)，接受腦部及腦血管組織的光學顯微鏡檢查，尋找其細胞凋亡之證據。

接受光學顯微鏡檢查的兔子，犧牲前以pentobarbital麻醉。將胸腔打開以 PE-50之導管放入左心房內。先打入200ml, heparinized saline，再以100之10% buffered formalin phosphate 作灌流。完成灌流手續之後，取出腦組織並浸於10% buffered formalin phosphate 溶液中。

經以上手續固定之兔腦，以冠狀向橫切，取其位於anterior commissure 附近之切片，埋入石臘之中，再切成5 μ 厚之薄片。以上的冠狀向腦組織切片，以 hematoxylin及 eosin (H-E)染色後，再以Apop Tag Kit(Oncor, Gaithersbury, Maryland, U.S.A.)作特殊染色。依Gavrieli等人研究發現，此種特殊染色，經由分子生物組織化學法，能染出細胞中之DNA fragmentation 及apoptotic bodies (16, 32)，而可證實細胞凋亡之存在。

以 Apop Tag Kit 特殊染色之切片，以200倍之放大率，於光學顯微鏡下檢查。顯微鏡並與影像分析儀連接，自動計算出含有DNA fragmentation 或apoptotic body之細胞數。

此種Apop Tag 染法之方法，首先化去固定腦組織切片之石臘再以 proteinase K 消化掉蛋白質，其次以2% H_2O_2 在 phosphate-buffered saline 中 quench 其 endogenous peroxidase 之活度。接著，把切片置於terminal deoxynucleotidyl transfer enzyme中，再予以wash buffer。經以上處置後之切片，滴上二滴anti-digoxigenin peroxidase，再以 diaminobenzidine 測出peroxidase之活性。在此試驗中，要標示的目標為新產生的DNA之3'-OH末端。此一方法標示出的DNA之3'-OH末端，一般而言都位於細胞核或apoptotic body上。此種直接以immunoperoxidase於組織薄切片上測出digoxigenin標示之DNA可讓我們找出經血管攣縮之變化後，含有DNA fragmentation 之細胞，亦即有細胞凋亡變化之部份。反之，在正常的細胞，一般而言，其具3'-OH末端之DNA很少，不能

被此Apop Tag Kit染色出。另外，如有果有細胞壞死而非細胞凋亡的變化產生時，也可能有DNA之斷端可為Apop Tag Kit所染出。此種染色一般比細胞凋亡之染色模糊。但是，最好的區分則是：細胞壞死時不但可被Apop Tag Kit染色，同時也可被hemotoxyline 染色。

在本實驗中，除了動物的腦部(特別是小腦及腦幹)外，其基底動脈及分枝,也以石臘固定而進行相同的檢查。

五、電子顯微鏡之檢查

另一半的實驗動物(實驗組廿隻，對照組十隻)則以3% glutaraldehyde phosphate buffer由心臟作灌流，取出腦部及基底動脈，再泡於相同的溶液中固定。同樣地，將腦組織作冠向切片。再由每切片中依其血管分佈之範圍，取左、右側各二至三塊(共四至六塊)之腦組織。這些腦組織再置於1% osmium tetroxide phosphate buffer 中，固定三小時後再以不同濃度之ethanol，逐漸脫水，最後包埋於araldite 之中並切成1.0 μ 左右之切片而以toluidine 染色。基底動脈與其分枝也以同法做成切片並染色。最後再於電子顯微鏡下檢查其細胞內之變化。

六、統計及結果分析

以上實驗之結果，將分別實驗組與對照組，在光學顯微鏡及電子顯微鏡下檢查之結果

(1)光學顯微鏡鏡檢

腦組織切片在300倍放大率之光學顯微鏡下檢查，如細胞內含有DNA之碎片或apoptotic body，則該細胞可認定為有細胞凋亡變化之細胞(apoptotic cell)。所有之標本每個檢查視野內之Apoptotic cell 以電腦影像自動分析儀，自動算出其數目。如此，統計廿個連續視野內之Apoptotic cell 之數目，並求其平均值作為該實驗動物Apoptotic cell 之數目。

(2)電子顯微鏡鏡檢

在電子顯微鏡下，檢查細胞內之變化，如果細胞有染色體之濃縮聚塊或片段，胞質內有空泡形成，但是所有的胞膜、粒腺體、內質網、核膜皆完整者，則界定為Apoptotic cell，也以與光學顯微鏡鏡檢相同之方法計算其每隻動物之平均Apoptotic cell 數。

(3)統計分析

實驗組與對照組(sham operation)之動物以unpaired Student-t test 作檢驗，求其統計上差異之意義。另也將所有動物在實驗前後，基底動脈攣縮之程度與其腦組織血管於組織形態學檢查中Apoptotic cell 數目多寡間之相關性，以ANOVA作分析。

1. 在本研究的第一年計劃中，我們預定在造成兔子之蜘蛛膜下腔出血後，可引發相當程度的基底動脈攣縮。取下其腦組織及基底動脈並施以特殊染色，再經由光學顯微鏡及電子顯微鏡作組織形態學之研究。希望可由此發現不但在腦組織內有因血管攣縮，造成腦缺血變化而形成之細胞凋亡之現象存在；同時在血管壁上也有細胞凋亡之情形發生。希望本研究計劃，能成為首次以動物實驗，證實細胞凋亡也發生於腦血管攣縮之變化中。
2. 在第二年的研究計劃中，我們希望以分子生物學的方法，研究細胞凋亡與腦血管攣縮之關係。將以相同之實驗模式，並應用 terminal transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)法，標示細胞凋亡之所產生之 DNA 變化。希望除了以組織形態學的方法外，也可以分子生物學的方法，證實細胞凋亡的變化，存在於腦血管攣縮後的腦血管壁及腦組織內。
3. 第三年的研究計劃中，我們將研究調節基因(regulating gene)與腦血管攣縮後細胞凋亡之關係，並將特別著重於 antiapoptotic gene 及 Cytochrome C 之作用。希望能藉此尋找可能的抑制腦血管攣縮後細胞凋亡過程產生的因素。進而使基因療法成為可能治療腦血管攣縮的一個方法。
4. 我們也希望經由這樣設計的一個實驗過程，使年青的住院醫師及助理們熟習基本的動物實驗及分子生物學實驗操作的方法。