

缺氧诱导因子-1 α 在蛛网膜下腔出血早期脑水肿形成中的作用

项欣欣

摘 要 **目的** 探究缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 在蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 早期脑水肿形成中的作用及相关机制。**方法** 采用改良血管内穿刺法制作 SAH 模型。雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠随机分成以下 3 组: SAH + 3-(5'-羟甲基-2'-呋喃基)-1-甲苯 (YC-1) 组; SAH + 二甲亚砜 (DMSO) 组; 假手术组 (sham 组)。手术后 24h 采集脑组织标本。分别用 Western blot 技术和免疫荧光染色技术检测 HIF-1 α 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达水平; 应用伊文思蓝法 (Evans blue, EB) 和干湿重法分别检测血脑屏障通透性和脑组织含水量; 同时记录大鼠术后 24h 神经功能评分及死亡率。**结果** 与 sham 组相比, SAH + DMSO 组中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达显著增多, 血脑屏障破坏和脑水肿明显加重 ($P < 0.05$); 相对于 SAH + DMSO 组, SAH + YC-1 组中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达显著性减少, 血脑屏障破坏和脑水肿明显减轻, 同时改善神经功能及降低大鼠死亡率 ($P < 0.05$)。**结论** HIF-1 α 可能通过诱导、调控 VEGF 的表达加重血脑屏障破坏, 从而促进 SAH 早期脑水肿的形成。YC-1 通过抑制 SAH 后 HIF-1 α 、VEGF 表达水平, 进而减轻 SAH 后血脑屏障破坏和早期脑水肿, 同时改善大鼠神经功能及降低大鼠死亡率。

关键词 蛛网膜下腔出血 缺氧诱导因子-1 α 血管内皮生长因子 脑水肿 早期脑损伤

[中图分类号] R743.35 [文献标识码] A

Role of Hypoxia Inducible Factor-1 α in Early Brain Edema Formation after Subarachnoid Hemorrhage in Rats. Xiang xinxin. Department of Neurosurgery, the People's NO. 4 Hosptal of Xiaoshan Hangzhou, Zhejiang 311225, China

Abstract **Objective** To investigate the role of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in early brain edema formation and its possible mechanism after experimental subarachnoid hemorrhage (SAH) in rat. **Methods** The monofilament puncture model was used to induce SAH in this study. Adult male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned into SAH + YC-1 group, SAH + DMSO group and sham group. Rats in the SAH + YC-1 group were treated with 2 mg/kg 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole (YC-1) at 24 h and 30 min before the induction of SAH, and rats of the SAH + DMSO group received equivolume DMSO vehicle. Brain samples were extracted at 24 h after surgery. Protein expression levels of HIF-1 α and vascular endothelial growth factor (VEGF) were analysed using western blot and immunofluorescence staining. The permeability of blood-brain barrier (BBB) and brain water content were assessed by Evans Blue (EB) and dry-wet method, respectively. Additionally, the mortality and neurological scores were recorded at 24 h after operation. **Results** Compared with the sham-operated group, increased expressions of HIF-1 α and VEGF, and remarkable brain edema and BBB extravasations were observed after SAH ($P < 0.05$). Compared to the SAH + DMSO group, inhibition of HIF-1 α with YC-1 suppressed the expression of VEGF, diminished BBB damage and brain edema, improved neurologic function and reduced mortality ($P < 0.05$). **Conclusion** These data indicated that HIF-1-induced VEGF increases BBB permeability and accelerate the formation of brain edema after SAH. YC-1 improved brain edema and neurologic function and reduced mortality after SAH, probably by inhibition of HIF-1 α and VEGF, which led to the preservation of the BBB function.

Key words Subarachnoid hemorrhage; Hypoxia inducible factor-1 α ; Vascular endothelial growth factor; Brain edema; Early brain injury

近年来,早期脑损伤 (early brain injury, EBI) 被认为是蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 患者高风险死亡和预后不良的重要影响因素^[1]。EBI 是 SAH 后脑组织 72h 内发生的直接损

伤,涉及颅内压增高、血脑屏障破坏、脑水肿、急性脑血管痉挛、细胞死亡和微血管功能障碍等病理生理过程^[2]。其中血脑屏障破坏和脑水肿在 SAH 后 EBI 中发挥重要作用^[3]。

缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 是由缺氧调节的 α 亚基 (HIF-1 α) 和持续

表达的 β 亚基(HIF-1 β)组成的一种异源二聚体复合物^[4]。自从 1988 年在人类肝癌细胞中发现 HIF-1 α 蛋白是一种调节靶基因的重要转录因子,研究者对其在缺血缺氧脑损伤中作用的研究从未间断过^[5]。当组织缺氧时,HIF-1 α 调节各种靶基因以适应缺氧诱导的不同的病理、生理变化^[6]。有报道显示 HIF-1 α 在 SAH 后表达上调,然而其在 SAH 后急性脑损伤的作用仍存在一定争议^[7-12]。研究表明血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是 HIF-1 α 的重要靶基因之一,其参与血脑屏障通透性增加和脑水肿发生^[13, 14]。本实验旨在探讨 HIF-1 α 及其靶基因 VEGF 在 SAH 早期脑水肿形成中的作用,进一步明确 SAH 后脑水肿的发生机制。

材料与方法

1. 实验材料及主要试剂:健康成年雄性 SD 大鼠,体重 280~300g,购于上海斯莱克实验动物有限公司。小鼠抗 HIF-1 α 单克隆抗体及兔抗 VEGF 单克隆抗体购于 Abcam 公司,内参 β -actin 购于 Santa cruz 公司,罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)及 FITC 标记山羊抗兔 IgG(H+L)购于北京中山金桥公司,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购于美国 Roche 公司,伊文思蓝、YC-1 购于美国 Sigma 公司,荧光显微镜(BX51)购于日本 Olympus 公司,恒冷箱冷冻切片机购于 Leica 公司。

2. 动物模型制作及分组:应用数字表法,将 SD 大鼠随机分成 SAH+YC-1 组、SAH+DMSO 组和 sham 组。SAH+YC-1 组大鼠经麻醉后 2mg/kg YC-1(溶于 DMSO 溶液)经尾静脉在制作 SAH 模型前 24h 和 30min 缓慢注入;SAH+DMSO 组大鼠在建立 SAH 模型前相同时间注入等体积 DMSO 溶液;sham 组大鼠不进行任何处理。实验采用 Bederson 等^[15]创立并改良的 SAH 模型。大鼠称重后经 1%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔麻醉,仰卧位固定于铺有电子恒温毯手术板上,维持体温在 $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。取颈正中切口,暴露右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA),游离结扎 ECA 上小分支动脉及 ECA 远心端并剪断。用显微动脉夹分别临时夹闭 ICA 和 CCA,轻轻拉直 ECA 使其与 ICA 大致成一条直线并在 ECA 上剪一小切口。用一根 4-0 尖头单丝尼龙线从小切口沿 ECA 反向插入 ICA,尼龙线头端距 CCA 分叉处 17~18mm 感到阻力,继续向内送入约 3mm 穿破血管壁。立即退出尼龙线,结扎 ECA 残端,缝合皮肤。sham 组大鼠除不刺破动脉管壁外其余步骤与其他组相同。在 24h 内死亡的大鼠及时补上,确保各组大鼠最后存活数量均为 20 只。

3. 大鼠神经功能评分、SAH 出血评分及死亡率统计:参照 Garcia 等^[16]制订经改良的 18 分评价法对大鼠进行神经功能评分。SAH 出血评分按照 Sugawara 等^[17]改良的评分方法执行。同时统计术后各组大鼠 24h 内死亡率。

4. 蛋白 Western blot 检测:大鼠($n=5$)被麻醉后经左心室用 PBS 灌注至右心房流出液体无色。迅速取出大鼠脑组织,用液氮速冻法冻存于 -80°C 冰箱。取右侧基底皮质样品(面对血块)匀浆后,在 4°C 下以 1000g 离心 10min,将所得上清液进一步离心分离。使用 CD 蛋白定量试剂盒(Bio-Rad)测定蛋白浓度。将等量的蛋白(60 μg)加入上样缓冲液中, 95°C 变性 5min,加入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶作电泳分离转膜。膜经脱脂牛奶封闭后,加入一抗 4°C 孵育过夜。一抗包括 HIF-1 α (1:1000, ab51608, Abcam 公司)和 VEGF (1:1000, ab46154, Abcam 公司), and β -actin (1:2000, Santa Cruz 公司)。膜清洗后经辣根过氧化物酶偶联的二抗于室温下孵育 1h 后。使用 X 线胶片检测蛋白条带,并用 Image J 软件作定量分析。

5. HIF-1 α 和 VEGF 免疫荧光染色:大鼠($n=5$)术后 24h 经麻醉后先后用 0.1mol/L PBS(磷酸盐缓冲液)和 4% 多聚甲醛灌注,迅速取出大鼠脑组织置于 4% 多聚甲醛固定 24h,随即放入 30% 蔗糖中脱水 72h。恒冷箱冷冻切片机冠状位连续切薄片贴敷载玻片上。标本经 0.01mol/L PBS 冲洗,山羊血清封闭,分别滴加一抗工作液(PBS 1:200 稀释的小鼠抗 HIF-1 α 和兔抗 VEGF), 4°C 湿盒孵育过夜, PBS 冲洗 5 次,分别滴加罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(红色)和 FITC 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(绿色)荧光二抗(稀释度均为 1:150), 37°C 湿盒避光孵育 90min, PBS 冲洗,加 DAPI(用于染细胞核)孵育 15min, 冲洗后封片,在荧光显微镜下观察并拍照。蓝色荧光为 DAPI 染出的细胞核,红色荧光为 HIF-1 α 阳性细胞,绿色荧光为 VEGF 阳性细胞。阴性对照用 PBS 替代一抗。

6. 脑屏障通透性检测:大鼠($n=5$)SAH 后 24h 麻醉后经股静脉注入 2% EB(5ml/kg), 1h 后经左心室 PBS 灌注至右心房流出液体无色。断头取脑,称取右大脑组织湿重后置于装有 3ml PBS 的试管中匀浆,离心(15000g, 30min, 4°C)后取 0.7ml 的上清液加入等体积的三氯乙酸和乙醇混合液(1:3), 4°C 孵育过夜。离心(15000g, 30min, 4°C)后取上清液,分光光度计(发射波长 680nm,吸收波长 620nm)测定其 OD 值,根据标准曲线计算脑组织 EB 含量(ng/g 脑湿重)。

7. 脑组织含水量检测:大鼠($n=5$)术后 24h 经麻醉断头取脑。用电子天平(精确到 0.1mg)迅速称取右侧大脑组织湿重,放入恒温干燥箱 100°C 烘烤 48h 至恒重,再称取干重(两次称重误差 $<0.2\text{mg}$)。脑组织含水量计算公式为:脑组织含水量(%) = (湿重 - 干重)/湿重 $\times 100\%$ 。

8. 统计学方法:使用 SPSS 19.0 统计软件分析,计量资料数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,结果分析采用 SNK-q 检验,卡方检验, Mann-Whitney U 检验及 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 神经功能评分、SAH 出血评分及死亡率分析:与 sham 组(16.85 ± 0.75)相比,SAH+DMSO 组大鼠神经功能评分(11.90 ± 1.71)明显下降($P < 0.05$);与 SAH+DMSO 组相比,SAH+YC-1 组大鼠神经

功能评分(13.55 ± 1.67)明显改善($P < 0.05$)。开颅取脑时, sham 组大鼠脑组织表面未见任何血凝块(图 1A), SAH + DMSO 组和 SAH + YC - 1 组大鼠 Willis 动脉环周围可见血凝块(图 1B), 表明建模成功。SAH + DMSO 组和 SAH + YC - 1 组 SAH 出血评分分别为 13.30 ± 1.78 和 13.15 ± 2.06 , 差异无统计学意义($P > 0.05$), 表明两组大鼠 SAH 损伤程度基本一

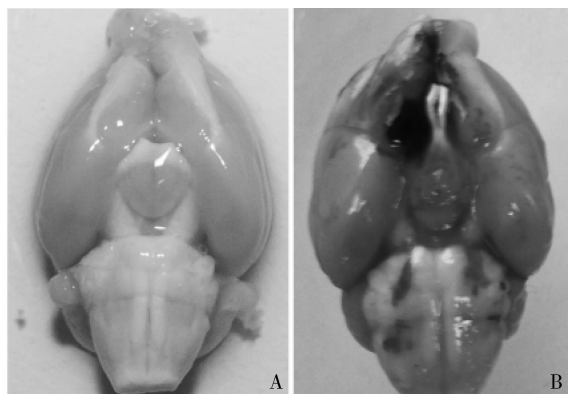


图 1 制备的 SAH 模型

A. sham 组; B. SAH 手术组

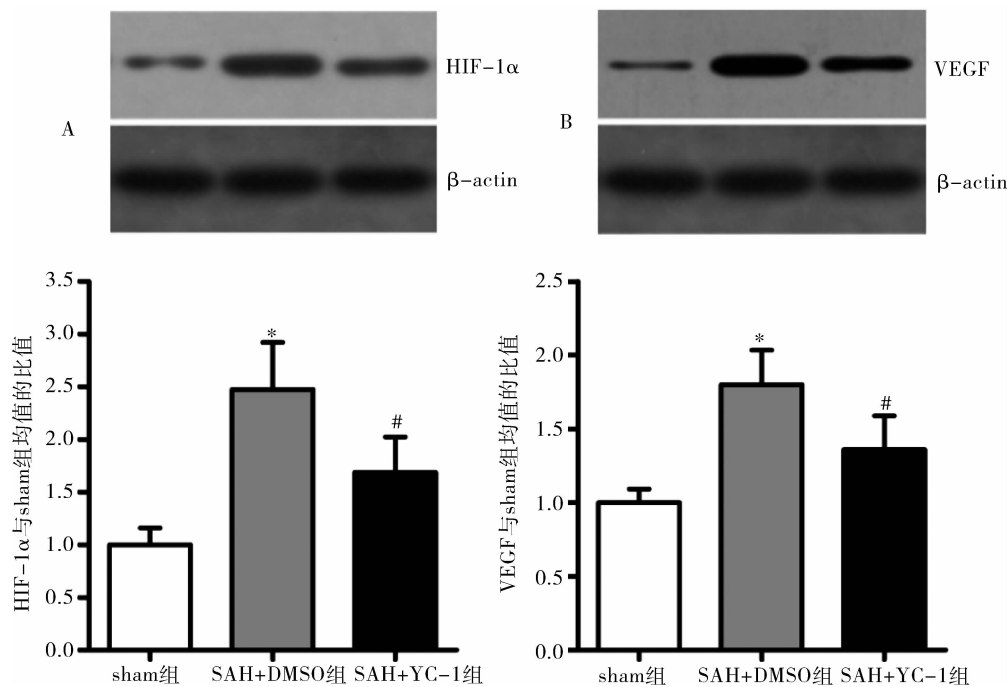


图 2 各组大鼠术后大脑皮质 24h HIF - 1 α 及 VEGF 蛋白表达水平

与 sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 SAH + DMSO 组比较, # $P < 0.05$ 。每组 5 只大鼠

致。SAH + YC - 1 组和 SAH + DMSO 组 SAH 后 24h 死亡率分别为 13.04% (3/23) 和 37.50% (12/32), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。sham 组没有大鼠死亡。

2. HIF - 1 α 及 VEGF 蛋白表达水平: HIF - 1 α 及 VEGF 蛋白 Western blot 法检测见图 2。与 sham 组相比, SAH + DMSO 组 HIF - 1 α 表达明显增多($P < 0.05$); 与 SAH + DMSO 组相比, SAH + YC - 1 组 HIF - 1 α 蛋白表达显著性减少($P < 0.05$), 但仍然多于 sham 组($P < 0.05$)。同样 SAH + DMSO 组和 SAH + YC - 1 组 VEGF 蛋白表达明显多于 sham 组($P < 0.05$); 但是与 SAH + DMSO 组相比较, SAH + YC - 1 组 VEGF 蛋白表达明显减少($P < 0.05$)。HIF - 1 α 及 VEGF 免疫荧光染色见图 3。sham 组几乎未见 HIF - 1 α 阳性细胞, SAH + DMSO 组可见大量 HIF - 1 α 阳性细胞, SAH + YC - 1 组 HIF - 1 α 阳性细胞数显著性减少; 同样在 sham 组中几乎未见 VEGF 阳性细胞, SAH + DMSO 组见大量的 VEGF 阳性细胞, 而 SAH + YC - 1 组 VEGF 阳性细胞数明显减少。

3. 脑组织 EB 含量和脑组织含水量: sham 组右大脑组织 EB 含量为 0.09 ± 0.03 ng/g; SAH + DMSO 组和 SAH + YC - 1 组右大脑组织 EB 含量较 sham 组明显增多($P < 0.05$); 但是 SAH + YC - 1 组右大脑组织

EB 含量较 SAH + DMSO 组明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。sham 组右侧脑组织含水量为 $79.12\% \pm 0.09\%$; 与 sham 组相比, SAH + DMSO 组大鼠右侧脑组织含水量显著性增高($P < 0.05$); 同

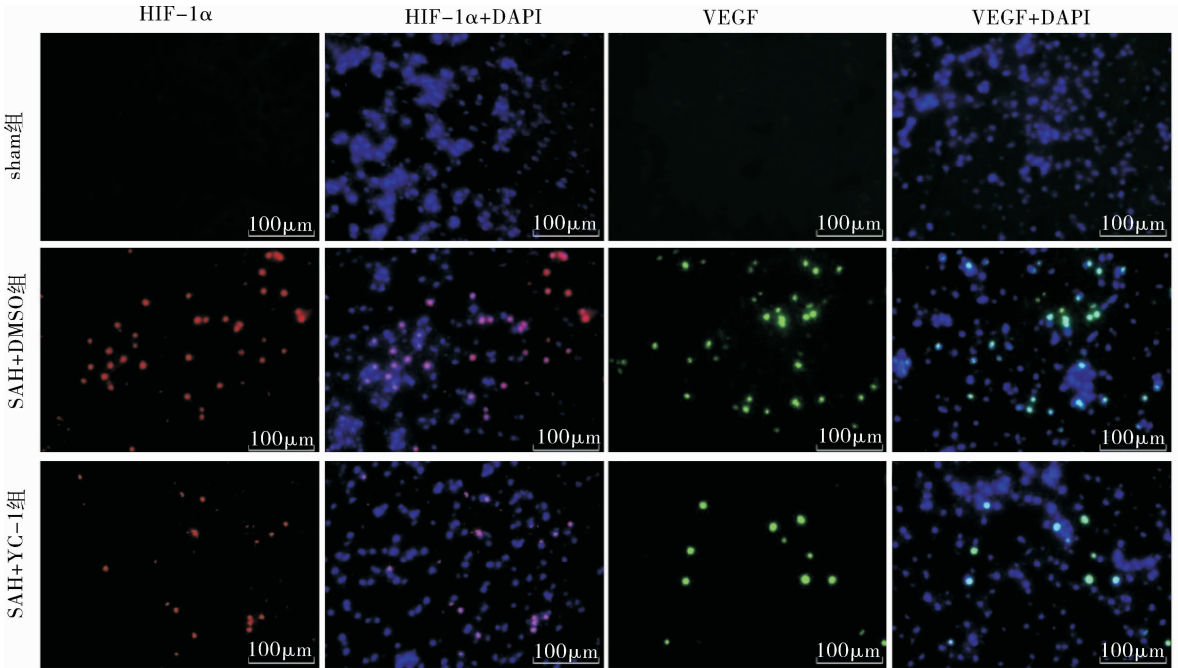


图 3 各组大鼠术后 24h 大脑皮质 HIF-1α 和 VEGF 免疫荧光染色

A ~ D. sham 组的 HIF-1α 和 VEGF 免疫荧光染色,E ~ H. SAH + DMSO 组的 HIF-1α 和 VEGF 免疫荧光染色,I ~ L. SAH + YC-1 组的 HIF-1α 和 VEGF 免疫荧光染色;HIF-1α 染色为红色(A、E 和 I),VEGF 染色为绿色(C、G 和 K),DAPI 染色为蓝色(B、F、J、D、H 和 L),HIF-1α 与 DAPI 重合染色为紫色(B、F 和 J),VEGF 与 DAPI 重合染色为青色(D、H 和 L)

SAH + DMSO 组相比,SAH + YC-1 组右侧脑组织含水量明显下降($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠术后 24h 脑组织 EB 含量和脑组织含水量

组别	n	脑组织 EB 含量 (ng/g)	脑组织含水量 (%)
sham 组	5	0.09 ± 0.04	79.12 ± 0.10
SAH + DMSO 组	5	0.36 ± 0.10 *	79.90 ± 0.23 *
SAH + YC-1 组	5	0.22 ± 0.08 #	79.43 ± 0.14 #

与 sham 组比较, * $P < 0.05$;与 SAH + DMSO 组比较, # $P < 0.05$

讨 论

SAH 是临床中常见的危重急症之一,12% 患者在就诊前死亡,40% 的患者在就诊后一个月内死亡,幸存者中几乎 50% 出现不同程度的神经功能障碍^[18]。颅内动脉瘤破裂是 SAH 发病的首要原因。近年来,研究表明针对 SAH 后迟发性脑血管痉挛的治疗并不能取得预期效果,EBI 被认为是决定 SAH 患者高病死率和高致残率的重要影响因素^[1,19]。血脑屏障破坏和脑水肿是 SAH 后 EBI 的重要病理、生理改变^[3]。同时研究者指出 SAH 后脑水肿的发生是血脑屏障破坏所致^[20]。

SAH 后颅内压升高、脑血流量下降致脑缺血缺

氧,进而导致血脑屏障破坏,毛细血管通透性改变,血浆外溢,聚集于细胞外间隙而形成血管性脑水肿,然而目前对于 SAH 急性期血脑屏障破坏的机体机制还不太清楚。本实验采用改良颈内动脉穿刺法建立 SAH 模型,应用 YC-1 抑制 SAH 后 HIF-1α 的表达,同时设置 SAH + DMSO 组、sham 组对照,分别应用 Western blot 法检测技术和免疫荧光染色技术检测术后 24h 脑组织中 HIF-1α 和 VEGF 表达水平,伊文思蓝法和干湿重法分别检测血脑屏障通透性和脑组织含水量,同时对大鼠术后 24h 神经功能和死亡率统计。本研究发现 SAH 后 24h 大脑皮质 HIF-1α、VEGF 表达显著性增多,血脑屏障通透性和脑组织含水量明显增加;YC-1 可抑制 SAH 后 HIF-1α 的表达,同时 VEGF 表达减少,血脑屏障破坏和脑水肿明显减轻,大鼠神经功能得到改善,大鼠死亡率明显下降。

在缺血或缺氧条件下,HIF-1α 通过介导一些基因如红细胞生成素和 VEGF 基因的转录,增加氧输送能力;调控葡萄糖转运体和糖酵解酶基因的转录,以维持细胞内环境稳定和增加代谢的适应性。VEGF 是一种内皮细胞专一性丝裂原和血管新生强烈的刺激因子,具有提高血管通透性、促进内皮细胞增殖等生理作用。在病理、生理状态下血管新生的过程中,

VEGF 是一个重要调节因子。VEGF 是 HIF - 1 α 介导的转录活化的一个重要靶点,其在低氧组织中的表达是通过 HIF - 1 α 诱导的。研究证实 VEGF5'端增强子上有与 HIF - 1 α 的结合位点。缺氧时表达增加的 HIF - 1 α 入核与 HIF - 1 β 聚合成 HIF - 1, HIF - 1 与 VEGF 基因增强子结合诱导 VEGF mRNA 转录活性增高,促进 VEGF 表达增多。研究显示大脑缺氧诱导 VEGF 的表达促使血脑屏障内皮细胞间紧密连接蛋白磷酸化、表达降低,从而增加血管通透性。目前有研究显示轻中度缺氧时,VEGF 上调促进细胞的存活;然而重度缺氧时,大量表达的 VEGF 促使血管通透性增加从而加重血脑屏障破坏。同时 Zhang 等在大鼠脑缺血模型中发现 VEGF 在缺血不同区域发挥的作用不同。最近的一项大鼠脑缺血模型研究中发现 YC - 1 通过抑制 HIF - 1 α 的表达,进而减少了 VEGF 表达,同时减轻了缺血急性期血脑屏障破坏和脑水肿。Wang 等^[9]通过视交叉池注血建立 SAH 模型,同时给予 2ME2 抑制 HIF - 1 α 的高表达,从而减轻 SAH 后 48h 血脑屏障破坏和脑水肿,提示 HIF - 1 α 在 SAH 在脑水肿的形成中起重要作用,与本研究一致。

本研究认为 SAH 后瞬间颅内压增高、血流量下降等病理、生理变化致脑组织急性缺氧促使 HIF - 1 α 表达增多,HIF - 1 α 诱导调控 VEGF 的大量表达,进而加重血脑屏障破坏和脑水肿形成。HIF - 1 α 阻滞剂 YC - 1 通过降低 HIF - 1 α 、VEGF 表达水平,减轻血脑屏障破坏、脑水肿,同时改善神经功能状态和降低大鼠死亡率,进一步证实了这一观点。

参考文献

- Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, *et al.* Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage[J]. *Stroke*, 1994, 25(7):1342 - 1347
- Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, *et al.* Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(8):916 - 925
- Cahill J, Zhang JH. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction? [J]. *Stroke*, 2009, 40(3 Suppl):S86 - 87
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, *et al.* Hypoxia - inducible factor 1 is a basic - helix - loop - helix - PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(12):5510 - 5514
- Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein[J]. *Science*, 1988, 242(4884):1412 - 1415
- Zhong H, Chiles K, Feldser D, *et al.* Modulation of hypoxia - inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3 - kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(6):1541 - 1545
- Ostrowski RP, Colohan AR, Zhang JH. Mechanisms of hyperbaric oxygen - induced neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(5):554 - 571
- Yan J, Chen C, Lei J, *et al.* 2 - methoxyestradiol reduces cerebral vasospasm after 48 hours of experimental subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Exp Neurol*, 2006, 202(2):348 - 356
- Wang Z, Meng CJ, Shen XM, *et al.* Potential contribution of hypoxia - inducible factor - 1 α , aquaporin - 4, and matrix metalloproteinase - 9 to blood - brain barrier disruption and brain edema after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. *J Mol Neurosci*, 2012, 48(1):273 - 280
- Dong Y, Li Y, Feng D, *et al.* Protective effect of HIF - 1 α against hippocampal apoptosis and cognitive dysfunction in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage[J]. *Brain Res*, 2013, 1517:114 - 121
- Wu C, Hu Q, Chen J, *et al.* Inhibiting HIF - 1 α by 2ME2 ameliorates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437(3):469 - 474
- 胡强,吴骋,陈敬寅,等.蛛网膜下腔出血大鼠早期大脑皮层低氧诱导因子 - 1 α 表达与细胞凋亡相关性研究[J]. *浙江大学学报:医学版*, 2014, 43(1):58 - 65
- Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, *et al.* VEGF enhances angiogenesis and promotes blood - brain barrier leakage in the ischemic brain[J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(7):829 - 838
- Jadhav V, Matchett G, Hsu FP, *et al.* Inhibition of Src tyrosine kinase and effect on outcomes in a new in vivo model of surgically induced brain injury[J]. *J Neurosurg*, 2007, 106(4):680 - 686
- Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat[J]. *Stroke*, 1995, 26(6):1086 - 1091
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, *et al.* Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. *Stroke*, 1995, 26(4):627 - 634
- Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, *et al.* A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model[J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 167(2):327 - 334
- Fujinaka T, Yoshimine T, Mashimo T. Management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *Masui*, 2012, 61(9):962 - 970
- Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, *et al.* Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double - blind, placebo - controlled phase 3 trial (CONSCIOUS - 2) [J]. *Lancet Neurol*, 2011, 10(7):618 - 625
- Doczi TP. Impact of cerebral microcirculatory changes on cerebral blood flow during cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *Stroke*, 2001, 32(3):817

(收稿日期:2014 - 05 - 12)

(修回日期:2014 - 05 - 23)