

· 基础研究 ·

亚低温干预联合青皮升压对局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及相关机制探讨

陈红 钱坤 曾非 黄晓琳

【摘要】目的 观察中药青皮联合亚低温干预对大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的保护作用及对脑梗死灶周边葡萄糖利用率(LCGU)的影响,同时探讨其相关的脑保护机制。**方法** 将 64 只实验大鼠随机分为对照组、青皮升压组、亚低温组及亚低温 + 升压组。将上述 4 组大鼠制成局灶性脑缺血再灌注模型,其中青皮升压组于缺血再灌注后给予升压干预,亚低温组于缺血再灌注后给予亚低温治疗,亚低温 + 升压组于缺血再灌注后同时给予升压及亚低温处理,对照组则未给予特殊处理。观察各组实验大鼠神经功能缺损评分、脑梗死灶体积及缺血侧大脑半球梗死灶周边区 LCGU 水平的变化情况。**结果** 青皮升压组、亚低温组及亚低温 + 升压组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死灶体积、LCGU 水平均明显低于对照组(均 $P < 0.05$);亚低温 + 升压组大鼠脑梗死体积、LCGU 水平明显低于青皮升压组及亚低温组(均 $P < 0.05$)。**结论** 升压及亚低温干预措施均对局灶性脑缺血再灌注损伤具有明显脑保护作用,两者联用具有协同功效,能进一步提高疗效,其相关治疗机制可能包括升压及亚低温协同治疗能改善缺血半暗带区局部脑血流量与 LCGU 不匹配的现象。

【关键词】 脑缺血/再灌注; 亚低温; 升压; 脑葡萄糖利用率

The protective effects and mechanism of Green Tangerine induced hypertension and mild hypothermia on brain infarction during focal cerebral ischemia and reperfusion CHEN Hong*, QIAN Kun, ZENG Fei, HUANG

Xiao-lin. * Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Medical College, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: QIAN Kun, Email: qiankun1129@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects of Green Tangerine induced hypertension and mild hypothermia on focal cerebral ischemia and reperfusion and local cerebral glucose utilization (LCGU) in the infarction rim in rats. **Methods** A total of 64 rats were used and randomly divided into a control group, a Green Tangerine induced hypertension group, a mild hypothermia group and a combination therapy group. The neurologic deficits, infarct size and LCGU were observed in the rats with focal cerebral ischemia and reperfusion. **Results** Compared with the control group, the neurologic deficits ($P < 0.05$), infarct size ($P < 0.01$) and LCGU ($P < 0.01$) were significantly lower in all treatment groups, the infarct size and LCGU of the combination therapy groups were lower than that of the hypertension group and mild hypothermia group ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypertension and mild hypothermia could provide cerebral protective effects during focal cerebral ischemia and reperfusion, and combination of mild hypothermia and hypertension therapy had greater protective effect than monotherapy. The protective mechanism might be attributed to the improvement of the disorder of rCBF and LCGU in the infarction rim synergistically caused by mild hypothermia and hypertension.

【Key words】 Cerebral ischemia, reperfusion; Mild hypothermia; Hypertension; Local cerebral glucose utilization

放射自显影实验发现,在机体脑缺血早期,脑缺血中心区(即梗死区)周围有一块葡萄糖利用率升高的区域,该区被认为是半暗带等值区^[1]。半暗带区为功能可逆区,在一定时间内如适当增加脑血流量(cerebral blood flow, CBF),则该区域内的神经元可恢复正常功能^[2],故半暗带区是临床治疗的重点区域之一。

目前已有大量学者采用低温进行脑保护及脑复苏干预研究,试图使神经元细胞免受缺血性损伤,并已证实亚低温(32 ~ 35℃)干预对缺血性脑损伤具有肯定的保护作用,它能在缺血性脑损伤级联反应各环节中发挥治疗作用^[3,4];但低温干预可同时导致血压下降、心输出量减少、脑灌注压降低,有加重脑缺血的危险^[5]。有研究发现,当机体发生局灶性脑缺血后,若适当给予升压治疗可提高脑灌注压水平^[5]。本实验采用青皮升压联合亚低温对局灶性脑缺血再灌注大鼠进行治疗,以观察二者联合应用能否发挥更好的脑保护效应并探讨相关的治疗机制。现将结果报道如下。

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科(陈红、黄晓琳),生殖医学中心(钱坤);武汉大学人民医院神经内科(曾非)

通讯作者:钱坤,Email:qiankun1129@sina.com

材料与方法

一、实验动物及分组

共选取健康雄性 Wistar 大鼠 64 只, 体重 200 ~ 250 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 将其随机分为对照组、青皮升压组、亚低温组及亚低温 + 升压组, 每组各 16 只大鼠。实验过程中密切监测各组大鼠的肛温、心率、血糖和平均动脉压水平。

二、大脑中动脉缺血再灌注模型制备

参见 Koizumi 大鼠局灶脑缺血再灌注损伤模型制备方法^[6], 采用 2% 戊巴比妥钠按 30 mg/kg 体重对各组大鼠进行腹腔注射, 待大鼠麻醉后取仰卧位固定, 行颈部正中切口, 分离一侧颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉, 结扎颈总动脉近心端, 在远心端预置一结扎线。在颈外动脉及颈内动脉分叉处结扎颈外动脉。经颈总动脉插入头端钝圆的 1.5 号单股尼龙线至大脑中动脉处, 以阻断大脑中动脉血流, 将颈总动脉连同尼龙线一起结扎后缝合皮肤。当脑缺血 3 h 后将尼龙线退至颈总动脉处行再灌注。

三、亚低温处理

采用冰毯或冰袋物理降温、全身喷洒稀释酒精及控制室温的方法对亚低温组及亚低温 + 升压组大鼠进行降温处理; 选用深部肛温法定时检测大鼠体温, 将电子测量计(中国预防医学科学院环境与卫生工程研究所研制)徐徐插入大鼠肛门内, 插入深度约为 5 cm。亚低温干预从缺血 2 h 时开始实施, 使肛温在 1 h 内降至 $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$ 并保持稳定, 持续 24 h 后处死动物。

四、青皮注射液制备及升压干预

采用水煮醇沉法制备青皮注射液, 药物浓度为 2 g/ml, 调节 pH 值至 7.2, 注射药液肉眼观呈黄褐色, 澄清透明, 无混浊及异物, 经高温、高压消毒后保存待用(由同济医院药剂科制备)。采用 Cardiocap 监护仪(丹麦产)测定各组实验大鼠股动脉血压。青皮升压组及亚低温 + 升压组于缺血 2 h 后采用微量输液泵于腹腔缓慢滴注稀释后的青皮注射液(1 g/kg 体重), 使血压维持在 120 ~ 130 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 水平, 持续 3 h。亚低温组及对照组大鼠则腹腔滴注等量生理盐水。

五、神经功能缺损评分

各组实验大鼠于处死前进行神经功能缺损评分, 参见 Longa 等^[6]介绍的 5 分制评分标准, 其中 0 分表示无神经功能障碍; 1 分表示轻度神经功能缺损, 前爪不能完全伸展; 2 分表示中度神经功能缺损, 向患侧转圈; 3 分表示严重神经功能缺损, 向患侧倾斜; 4 分表示昏迷、意识不清。

六、脑梗死灶体积测量

当实验进行 24 h 后, 从各组动物中分别取 8 只大鼠迅速断头取脑, 将脑组织置于 -20°C 环境中冷冻 20 min, 随后行冠状切片, 片厚约 2 mm, 将切片立即置入含 10% 红四氮唑(TTC)磷酸缓冲液(50°C)中避光恒温孵育 5 min, 其中脑梗死区不着色, 正常脑组织则被染成红色。采用 MPLAS-500 型多媒体彩色病理图像分析系统计算脑梗死灶面积(S), 梗死灶大小按公式 $V = Sd/T2$ (S 为梗死灶面积, d 为厚度, T 为线性放大倍数) 进行计算, 从而得出脑梗死灶体积。

七、局部脑组织葡萄糖利用率测定

各组实验动物于处死前 1 h 分别取 8 只大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)进行麻醉, 同时实施股动、静脉插管, 待大鼠清醒后, 从股静脉注射 14C 去氧葡萄糖溶液(14C-DG, 3.7 MBq/kg, Amersham International pl 公司出品, 放射活性为 12.5 MBq/mg), 于 45 s 内注射完毕。分别在 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 30 及 45 min 时抽股动脉血 1 次(共计 10 次), 0.2 ml/次, 以 2000 r/min 离心 5 min, 取 10 μl 血浆测血糖水平(所用血糖仪为美国强生公司产品); 另取 100 μl 血浆置入液闪瓶内, 将消化液(含等体积的 60% 高氯酸 + 两倍于样本体积的 H_2O_2)置于 50°C 环境中消化过夜后加入闪烁液, 测定血液 14C-DG 活性(液闪测定仪, 由武汉大学医学院实验中心提供)。实验大鼠于麻醉剂生效 45 min 后立即断头取脑, 将脑标本组织置于 -50°C 异戊烷中, 待冻硬后取出并保存于 -70°C 冰箱内备检, 然后行冠状面超薄冰冻切片(片厚约 20 μm), 从额极向后 2, 4, 6, 8, 10 mm 每隔 2 mm 取 1 片, 于 60°C 环境下烘干。实验用 X 光胶片为 Kodak 公司出品, 采用 HPIAS 1000 型高清晰度彩色病理图文分析系统(由华中科技大学同济医学院千屏影像工程公司提供)进行光密度分析, 参照 Sokoloff 等^[7]提供的方程计算半暗带区的脑梗死灶周边葡萄糖利用率(local cerebral glucose utilization, LCGU)。

八、统计学分析

本研究所得数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 统计学方法包括方差分析及两样本间 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组实验大鼠生理参数比较

在环境温度为 25°C 情况下, 各组实验大鼠基础血压、心率及血糖水平在缺血前及处死前均无明显变化($P > 0.05$); 其中亚低温组、青皮升压组及亚低温 + 升压组大鼠心率水平较对照组明显降低($P < 0.05$)。

二、各组实验大鼠血压变化情况分析

各组实验大鼠在缺血前及处死前其血压均无明显

变化($P>0.05$);当缺血 3 h 时,对照组和亚低温组血压与缺血前比较,差异无统计学意义($P>0.05$),青皮升压组及亚低温 + 升压组大鼠血压明显高于对照组和亚低温组($P<0.01$),具体数据详见表 1。

表 1 各组实验大鼠不同时间点平均动脉血压变化情况比较 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	缺血前	缺血后 3 h	处死前
对照组	8	102.7 ± 7.03	103.5 ± 6.20	102.6 ± 7.01
青皮升压组	8	101.4 ± 6.13	127.3 ± 3.56 ^a	101.5 ± 6.10
亚低温组	8	102.8 ± 5.56	101.9 ± 4.76	100.8 ± 5.09
亚低温 + 升压组	8	102.5 ± 6.06	126.7 ± 4.68 ^a	102.3 ± 5.06

注:与对照组、亚低温组比较, ^a $P<0.01$

三、各组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死灶体积及梗死灶周边 LCGU 变化情况比较

青皮升压组、亚低温组及亚低温 + 升压组大鼠神经功能缺损评分均显著低于对照组($P<0.05$)。青皮升压组、亚低温组及亚低温 + 升压组脑梗死灶体积亦明显小于对照组($P<0.01$);进一步分析后发现,亚低温 + 升压组脑梗死灶体积明显小于青皮升压组及亚低温组($P<0.05$);青皮升压组、亚低温组及亚低温 + 升压组 LCGU 水平均明显低于对照组($P<0.01$),亚低温 + 升压组 LCGU 水平明显低于青皮升压组和亚低温组($P<0.05$),具体数据详见表 2。

表 2 各组实验大鼠神经功能缺损评分、脑梗死灶体积及 LCGU 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	神经功能缺损评分(分)	脑梗死灶体积(mm ³)	LCGU($\mu\text{mol} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
对照组	8	3.125 ± 0.835	410.8 ± 89.4	182.7 ± 23.0
青皮升压组	8	2.315 ± 0.501 ^a	208.4 ± 53.7 ^b	80.4 ± 10.3 ^b
亚低温组	8	2.125 ± 0.991 ^a	210.5 ± 40.5 ^b	42.9 ± 11.2 ^b
亚低温 + 升压组	8	1.550 ± 0.707 ^a	115.5 ± 21.9 ^{bc}	26.3 ± 0.9 ^{bc}

注:与对照组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$;与青皮升压组、亚低温组比较, ^c $P<0.05$

讨 论

血压是影响机体脑灌注压最重要的因素之一,维持适当的血压对保证脑灌注压具有重要意义,多数脑血管病患者的动脉血压改变是决定其脑组织血流量及脑梗死灶体积的主要因素。目前临床上多数抗缺血药物是通过正常血压动物实验研制的,这些药物对高血压动物或高血压患者的作用有限,有些抗脑梗死药物造成的低血压副作用甚至抵消了其对脑缺血损伤的保护作用^[8]。因此,对脑缺血患者进行适当的升压治疗具有重要意义,可提高其缺血区脑灌注量,从而发挥脑保护作用。有研究发现,当夹闭实验兔大脑中动脉后,其局部脑血流量降低(71 ± 2)%,而当同时给予苯福林使其血压升高至 65 mmHg 以后,其局部脑血流量

可恢复至原先正常水平的(84 ± 3)%,并且缺血 2 h 再灌注升压治疗组脑梗死灶体积较对照组减少 45%^[5]。本研究结果显示,脑缺血 2 h 后用青皮升压治疗实验大鼠,发现其神经功能缺损评分和脑梗死灶体积均明显低于对照组,证实脑缺血后升压治疗确有脑保护效应,与相关文献报道结果一致;另外单独应用亚低温对缺血再灌注大鼠进行干预,发现其神经功能缺损评分、脑梗死灶体积亦明显低于对照组,证实亚低温干预对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤也有一定程度的脑保护作用。亚低温 + 升压组大鼠脑梗死灶体积明显小于青皮升压组及亚低温组,其神经功能缺损评分也明显低于青皮升压组及亚低温组,表明升压与亚低温干预在治疗脑缺血再灌注损伤方面具有协同功效。

尽管亚低温及升压治疗对脑缺血再灌注损伤具有肯定的治疗作用,但其确切的治疗机制目前仍不清楚。有文献报道,亚低温干预可以降低组织氧耗量、抑制兴奋性神经递质释放、减轻脑水肿等^[9,10]。本研究结果发现,亚低温干预能明显降低脑梗死灶周边区域糖代谢水平。在脑缺血早期,脑组织半暗带区出现葡萄糖利用率增高区^[1,3],该区域内无氧糖酵解活动增加^[3],局部脑血流量与 LCGU 严重不匹配(即局部脑血流量低而 LCGU 高),与半暗带区最终转变为梗死灶具有密切关系。亚低温干预对局部脑血流量无明显影响^[11],但可降低机体 LCGU 水平,能改善局部区域脑血流量与 LCGU 的不匹配程度,促进其重新达到动态平衡。本研究认为,降低脑缺血组织葡萄糖代谢率可能是亚低温对缺血性脑损伤的主要治疗机制之一。

虽然升高血压可能导致脑梗死灶出血、血管源性水肿等,但适当的升压干预能增强缺血脑区的侧枝循环,抑制迟发性缺血后低灌注所引发的神经损伤^[12]。本研究发现,当向大鼠腹腔注射青皮药液使其血压升高 20 ~ 30 mmHg 时,其脑梗死灶周边区 LCGU 水平明显低于对照组,推测升压干预能导致脑灌注压升高,使局灶脑缺血区侧枝循环增加,血流量增高,抑制半暗带区的无氧糖酵解过程。亚低温 + 升压组大鼠脑 LCGU 水平明显低于亚低温组及青皮升压组,提示升压与亚低温干预对 LCGU 的影响具有协同作用,其中升压治疗导致局部脑血流量增加,抑制了无氧糖酵解过程,同时亚低温干预降低了脑组织对糖的利用率,促使局部脑缺血区血流量与 LCGU 重新达到平衡,对治疗大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有积极意义。

参 考 文 献

- [1] Kita H, Shima K, Tatsumi M, et al. Cerebral blood flow and glucose metabolism of the ischemic rim in spontaneously hypertension stroke prone rats with occlusion of the middle cerebral artery. J Cereb Blood Flow Metab, 1995, 15: 235.

- [2] Memezawa H, Siesjo B, Smith ML, et al. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 1992, 23;552-559.
- [3] Nakashima K, Todd MM. Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemia depolarization. *Stroke*, 1996, 27;913.
- [4] Kader A, Frazzini VI, Baker CJ. Effect of mild hypothermia on nitric oxide synthesis during focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*, 1994, 35;272.
- [5] Smrecka M, Ogilvy CS, Crow RJ, et al. Induced hypertension improves regional blood flow and protects against infarction during focal ischemia; time course of changes in blood flow measured by laser doppler imaging. *Neurosurg*, 1998, 42;617.
- [6] Longa FZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20;84.
- [7] Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, et al. The $[14c]$ deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization; theory, procedure and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem*, 1977, 28;897-916.
- [8] McCulloch J. Neuroprotective drug development in stroke; blood pressure and its impact. *J Hypertens Suppl*, 1996, 14;131.
- [9] Tohyama Y, Sako K, Yonemasu Y. Hypothermia attenuates hyperglycolysis in the periphery of ischemic core in rat brain. *Exp Brain Res*, 1998, 122;333.
- [10] Bacher A, Kwon JY, Zornow MH. Effect of temperature on cerebral tissue oxygen tension, carbon dioxide tension and pH during transient globe ischemia in rabbits. *Anesthesiology*, 1998, 88;403-409.
- [11] Frietsch T, Krafft P, Piepgras A, et al. Relationship between local cerebral blood flow and metabolism during mild and moderate hypothermia in rats. *Anesthesiology*, 2000, 92;754-763.
- [12] Ogilvy CS, Chu D, Kaplan S, et al. Mild hypothermia, hypertension, and mannitol are protective against infarction during experimental intracranial temporary vessel occlusion. *Neurosurgery*, 1996, 38;1202-1210.

(修回日期:2007-08-19)
(本文编辑:易 浩)

· 短篇论著 ·

微波辅助治疗小儿急性腹泻的疗效观察

郭玮

小儿腹泻是儿科常见病、多发病,其发病率在儿科疾病中占第二位,对患儿健康带来极大危害。目前对小儿急性腹泻的常规治疗为抗感染、补液及对症退热、收敛、解痉等,我科采用微波辅助上述方法综合治疗小儿急性腹泻取得了良好疗效,现报道如下。

一、资料与方法

1. 一般资料:选择 2005 年 2 月至 2006 年 4 月我科收治的急性腹泻患儿 146 例,均符合中国腹泻病诊断治疗方案的诊断标准^[1]。表现为腹痛、阵发性哭闹,腹泻每日 6~10 余次不等,水样或蛋花汤样便含有大量奶瓣或黏液便,腹胀,有不同程度的脱水等,部分患儿在发病早期伴有发热、呕吐,大便镜检示脂肪球或无异常或有白细胞少许,大便培养无致病菌生长。将 146 例患儿分为治疗组 79 例,其中男 45 例,女 34 例;年龄为 5 个月~2 岁;病程为 (2.4 ± 0.67) d。对照组 67 例,其中男 36 例,女 31 例;年龄为 5 个月~2.8 岁;病程为 (2.1 ± 0.78) d。2 组患儿年龄、病程及病情程度差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。

2. 治疗方法:2 组患儿均给予抗感染、补液、收敛(口服思密达)、退热等常规治疗 3~5 d。治疗组在此基础上加用微波治疗,采用天津产 TJSM-92B 型多功能微波治疗仪,微波波长为 12.24 cm,频率为 2 450 MHz,功率为 4~6 W,将直径为 15 cm × 8 cm 的长方形辐射头放置于小儿腹部(辐射头距腹部皮肤 1~2 cm,以神阙穴为中心,包括关元穴),每日 1 次,每次 10~15 min,2~3 d 为 1 个疗程。

3. 疗效判断标准:根据腹泻病疗效判断标准的补充建议^[2]判断疗效,显效——治疗 3 d,粪便性状及次数恢复正常,全身症状消失;有效——治疗 3 d,粪便性状明显好转,次数减少,全

身症状明显改善;无效——治疗 3 d,粪便性状及次数、临床症状无变化甚至恶化。

4. 统计学分析:组间疗效比较采用 χ^2 检验,均数的比较采用 U 检验。

二、结果

2 组患儿腹痛缓解时间、腹泻消失时间及疗程见表 1。2 组患儿疗效比较见表 2。

表 1 2 组患儿腹痛缓解时间、腹泻消失时间及疗程比较
($\bar{d}, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	腹泻消失时间	腹痛缓解时间	疗程
治疗组	79	3.10 ± 0.79^a	2.15 ± 0.53^a	3.34 ± 0.80^a
对照组	67	5.17 ± 1.72	3.69 ± 0.85	5.01 ± 1.54

注:与对照组比较, $^a P < 0.01$

表 2 2 组患儿疗效比较(例)

组别	例数	有效	显效	无效	总有效率(%)
治疗组	79	48	27	4	94.94 ^a
对照组	67	24	29	14	79.10

注:与对照组比较, $^a P < 0.01$

从表 1 中主要临床症状改善时间及疗程上看,治疗组明显优于对照组。从表 2 可见治疗组总有效率明显高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

三、讨论

腹泻病的发病率在中国小儿常见多发病中居第二位,仅次于呼吸道感染^[3]。因小儿消化器官发育及功能尚不完善,胃酸及消化酶分泌不足,对食物耐受性差,加之免疫功能差,故极易受到感染或非感染因素影响而致腹泻,治疗不当或不及时易成为慢性腹泻。临床表现主要是频繁腹泻、水样便、呕吐、发热、腹痛、脱水等。近年来许多学者报道微波辅助治疗小儿支气管