

· 基础研究 ·

不同介入时间和不同疗程高压氧治疗对脑出血大鼠神经功能的影响

彭小岭 曾宪容 潘福琼 谢清明 彭梅

【摘要】 目的 观察不同介入时间和不同疗程的高压氧(HBO)治疗对脑出血(ICH)大鼠神经功能的影响。**方法** 将SD大鼠60只采用自体股动脉血法制作大鼠脑出血模型,造模成功后按随机数字表法随机分为不进行HBO治疗的无HBO组和进行HBO治疗的HBO组。HBO组按脑出血造模成功后HBO介入的不同时间分为5个亚组,包括造模成功后3h开始HBO治疗的HBO 3h组;造模成功后6h开始HBO治疗的HBO 6h组;造模成功后1d开始HBO治疗的HBO 1d组;造模成功后2d开始HBO治疗的HBO 2d组;造模成功后7d开始HBO治疗的HBO 7d组,每个亚组6只大鼠;无HBO组也按照HBO组的分组方法分为5个亚组(均不接受HBO治疗),包括无HBO 3h组、无HBO 6h组、无HBO 1d组、无HBO 2d组和无HBO 7d组,每个亚组6只大鼠。分别于治疗前、治疗10d后、治疗20d后、治疗30d后共4个时间点采用Longa评分法对2组(10个亚组)大鼠进行神经功能缺损评分。**结果** HBO治疗10d、20d、30d后,HBO组各亚组与无HBO组同介入时间亚组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗10d后、治疗20d后,HBO 3h组分别为(2.17 ± 0.75)分和(1.00 ± 0.63)分,分别与HBO 2d组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗10d后、治疗20d后、治疗30d后,HBO 3h组与HBO 7d组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗10d、治疗20d后,HBO 6h组与HBO 2d组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗10d后、治疗20d后、治疗30d后,HBO 6h组与HBO 7d组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗10d后、治疗20d后,HBO 1d组与HBO 2d组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗10d后、治疗20d后、治疗30d后,HBO 1d组与HBO 7d组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗10d后、治疗20d后、治疗30d后,HBO 2d组与HBO 7d组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。HBO 3h组、HBO 6h组、HBO 1d组、HBO 2d组4个亚组的大鼠HBO治疗10d后与组内HBO治疗20d后大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗30d后,HBO组各亚组与组内治疗10d和20d后比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** HBO治疗可降低脑出血大鼠神经功能评分,促进神经功能的恢复,HBO介入时间以脑出血后 ≤ 1 d为最佳,且疗程越长则疗效越好。

【关键词】 高压氧治疗; 介入时间; 疗程; 脑出血; 神经功能恢复

基金项目:四川省人民医院苗圃课题(30305031041)

Hyperbaric oxygen therapy can help restore neurological function after intracerebral hemorrhage Peng Xiaoling*, Zeng Xianrong, Pan Fuqiong, Xie Qingming, Peng Mei. *Department of Hyperbaric Oxygen, The People's Hospital of Sichuan Province, Chengdu 610072, China
Corresponding author: Peng Xiaoling, Email: LRPXL@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on neurological functioning in rats modelling cerebral hemorrhage (ICH). **Methods** Sixty Sprague-Dawley rats had intracerebral hemorrhage induced by injecting autologous blood. They were then randomly divided into an HBO-free group and an HBO group, each of 30 according to a random number table. The HBO group was further divided into HBO 3 h, HBO 6 h, HBO 1 d, HBO 2 d and HBO 7 d groups which received HBO therapy for 3 hours, 6 hours, 1 day, 2 days and 7 days respectively. Each had 6 members. The HBO-free rats were also divided into analogous HBO-free 3 h, HBO-free 6 h, HBO-free 1 d, HBO-free 2 d and HBO-free 7 d groups, and give no HBO intervention. All of the rats were evaluated for neurological impairment using the Longa scoring method before the treatment and 10 days, 20 days and 30 days af-

terward. **Results** After 10, 20 and 30 days of HBO treatment, there were significant differences in neurological functioning between each pair of HBO-free and HBO-treated groups. After 10 and 20 days of HBO treatment the average neurological function score of the HBO 3 h group was significantly different from that of the HBO 2 d group. The average score in the HBO 7 d group was also significantly different from that of the HBO 3 h, HBO 6 h, HBO 1 d and HBO 2 d groups after 10, 20 and 30 days of HBO treatment. The average scores of the HBO 3 h, HBO 6 h, HBO 1 d and HBO 2 d groups improved significantly between 10 and 20 days after the treatment. The average score of the rats which received 30 days of treatment was also significantly different from those after 10 and 20 days. **Conclusion** HBO treatment can improve neurological function after cerebral hemorrhage, at least in rats. The best time to start HBO treatment is no later than 24 hours after the hemorrhage. The curative effect increases with extension of the treatment's duration.

【Key words】 Hyperbaric oxygen treatment; Intervention scheduling; Cerebral hemorrhage; Neurological function recovery

Fund program: A Miaopu Project of Sichuan Provincial People's Hospital (No. 30305031041)

脑水肿是脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 后最主要的继发性病理生理变化,是导致患者神经功能恶化和不良预后的重要因素之^[1-3],已有动物实验和临床研究表明,高压氧 (hyperbaric oxygen, HBO) 可通过减轻 ICH 后的脑水肿来促进神经功能的恢复^[4-8]。目前,鲜见关于 HBO 治疗脑出血的最佳时期和疗程的研究,且尚存争议。本研究旨在通过观察不同介入时间和不同疗程的 HBO 治疗对脑出血大鼠的神经功能的干预效果,以期为临床脑出血的高压氧治疗提供实验室证据。

材料与方法

一、主要器材

大鼠脑立体定向仪 (美国 Stoelting 公司)、动物舱 (烟台宏远氧业有限公司, GB150-98 型, 许可证编号为 TS2210455-2010)。

二、实验动物分组

健康、成年、雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只, 体重 250~300 g, 由四川省人民医院实验动物研究所提供 [动物生产许可证号: SCXK (川) 2013-15], 分笼饲养于四川省人民医院动物实验室内, 以标准饲料喂养并饮用自来水。将 SD 大鼠 60 只造模后按随机数字表法随机分为 2 个大组, 即不进行 HBO 治疗的无 HBO 组和进行 HBO 治疗的 HBO 组。HBO 组按脑出血造模成功后 HBO 介入的不同时间分为 5 个亚组, 包括造模成功后 3 h 开始 HBO 治疗的 HBO 3 h 组; 造模成功后 6 h 开始 HBO 治疗的 HBO 6 h 组, 造模成功后 1 d 开始 HBO 治疗的 HBO 1 d 组, 造模成功后 2 d 开始 HBO 治疗的 HBO 2 d 组, 造模成功后 7 d 开始 HBO 治疗的 HBO 7 d 组, 每个亚组 6 只大鼠; 无 HBO 组也按照 HBO 组的分组方法分为 5 个亚组 (但均不接受 HBO 治疗), 包括无 HBO 3 h 组、无 HBO 6 h 组、无 HBO 1 d 组、无 HBO 2 d 组和无 HBO 7 d 组, 每个亚组

6 只大鼠。

三、脑出血大鼠模型制造

无 HBO 组和 HBO 组大鼠均参照田亚楠^[9]等报道的自体股动脉取血法制作脑出血模型, 具体制模方法如下: ①股动脉抽血——将大鼠称重后, 用 10% 水合氯醛 (3.5 ml/kg 体重) 进行腹腔麻醉, 仰卧位固定, 右侧腹股沟备皮, 纵行切口, 暴露并分离右侧股动脉, 结扎远心端, 用肝素化 50 μ L 微量注射器穿刺股动脉抽取 50 μ L 自体动脉血, 结扎股动脉近心端, 缝合皮肤。②立体定向术注射自体血——将大鼠俯卧位固定在立体定向仪上, 后调整立体定向仪使门齿钩平面比耳间线平面低 2.4 mm, 头颅背侧剪去鼠毛, 消毒后于正中切开约 10 mm 纵行切口, 3% 的双氧水剥蚀骨膜, 暴露前凶点; 于前凶点电钻钻一直径约 1 mm 的小孔, 注意不伤及硬脑膜, 将微量进样器固定于此, 向脑内尾状核注射自体股动脉血, 深度为 5.5 mm, 缓慢注射 15 μ L 血液 (注射速度 10 μ L/min), 静置 7 min 后再以相同速度注射其余 35 μ L 血液, 留针 10 min 后缓慢拔针。骨蜡封闭骨窗, 撒青霉素粉剂消毒, 缝合头皮, 放于 24 $^{\circ}$ C 环境中观察, 待大鼠完全苏醒后送回饲养室。造模结束后, 参照 Longa 评分法对所有大鼠进行评分^[10], 剔除 0 分和 4 分的大鼠, 1~3 分即为造模成功。

四、高压氧干预

HBO 组大鼠采用烟台宏远氧业有限公司制造的动物实验纯氧舱 (许可证编号 TS2210455-2010) 进行 HBO 干预, 首先将大鼠置于纯氧舱中, 舱内温度 22~24 $^{\circ}$ C, 用纯氧洗舱 10 min, 排除舱内其他气体, 加压 15 min, 加压至 0.1 MPa (绝对压 2.0 ATA), 稳压吸纯氧 60 min, 其间用纯氧通气 10 min。吸氧结束后, 15 min 内匀速减至常压, 每天干预 1 次, 10 d 为 1 个疗程, 连续干预 3 个疗程。无 HBO 组大鼠置于高压氧舱内, 常压下空气通风, 模拟除压力和氧浓度以外

的实验过程和环境条件,每天干预 1 次,10 d 为 1 个疗程,连续干预 3 个疗程。实验过程中需仔细观察动物在舱内的行为状态。按治疗疗程,分为 4 个时间点进行观察:治疗前、治疗 10 d 后、治疗 20 d 后、治疗 30 d 后。

五、大鼠神经功能缺损评分

分别于治疗前、治疗 10 d 后、治疗 20 d 后、治疗 30 d 后共 4 个时间点采用 Longa 评分法^[10]对 2 组大鼠进行神经功能缺损评分。0 分为没有神经功能缺损;1 分为对侧前爪不能完全伸直;2 分为行走时,大鼠向对侧转圈;3 分为行走时,大鼠身体向对侧(瘫痪侧)倾斜;4 分为不能自发行走,有意识丧失。

六、统计学分析

采用 SPSS 17.0 版统计软件进行数据分析,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,应用 ANOVA 对多组计量资料间均数进行方差分析,检验水准取 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、2 组大鼠各亚组大鼠神经功能评分的比较

HBO 治疗前,HBO 各亚组与无 HBO 各亚组大鼠神经功能评分比较差异均无统计学意义($P>0.05$);HBO 治疗 10 d、20 d、30 d 后,HBO 组各亚组与无 HBO 组同介入时间亚组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)见(表 1)。

二、HBO 组各亚组不同介入时间大鼠神经功能评分的比较

治疗前、治疗 10 d 后、治疗 20 d 后、治疗 30 d 后,HBO 3 h 组与 HBO 6 h 和 HBO 1 d 组大鼠神经功能评分比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);治疗 10 d 后、治疗 20 d 后,HBO 3 h 组与 HBO 2 d 组大鼠神经功能

评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),但在治疗 30 d 后,2 亚组间差异无统计学意义($P>0.05$);治疗 10 d 后、治疗 20 d 后、治疗 30 d 后,HBO 3 h 组与 HBO 7 d 组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),详见表 1。治疗前、治疗 10 d 后、治疗 20 d 后、治疗 30 d 后,HBO 6 h 组与 HBO 1 d 组大鼠神经功能评分比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);治疗 10 d 后、治疗 20 d 后,HBO 6 h 组与 HBO 2 d 组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),但在治疗 30 d 后,2 亚组间差异无统计学意义($P>0.05$);治疗 10 d 后、治疗 20 d 后、治疗 30 d 后,HBO 6 h 组与 HBO 7 d 组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗 10 d 后、治疗 20 d 后,HBO 1 d 组与 HBO 2 d 组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),但在治疗 30 d 后,2 亚组间差异无统计学意义($P>0.05$);治疗 10 d 后、治疗 20 d 后、治疗 30 d 后,HBO 1 d 组与 HBO 7 d 组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗 10 d 后、治疗 20 d 后、治疗 30 d 后,HBO 2 d 组与 HBO 7 d 组大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。具体数据见表 1。

三、HBO 组各亚组不同疗程组内大鼠神经功能评分比较的结果

HBO 3 h 组、HBO 6 h 组、HBO 1 d 组、HBO 2 d 组 4 个亚组的大鼠 HBO 治疗 10 d 后与组内 HBO 治疗 20 d 后大鼠神经功能评分比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),HBO 7 d 组大鼠 HBO 治疗 10 d 后与组内 HBO 治疗 20 d 后大鼠神经功能评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗 30 d 后,HBO 组各亚组与组内治疗 10 d 和 20 d 后比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),详见表 1。

表 1 HBO 组与无 HBO 组不同介入时间和不同疗程高压氧治疗后大鼠神经功能评分比较(分, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	治疗前	治疗 10 d 后	治疗 20 d 后	治疗 30 d 后
HBO 3 h 组	6	1.83±0.98	2.17±0.75 ^a	1.00±0.63 ^{af}	0.33±0.52 ^{afg}
HBO 6 h 组	6	1.83±0.76	2.33±0.52 ^a	1.33±0.52 ^{af}	0.50±0.55 ^{afg}
HBO 1 d 组	6	2.17±0.75	2.50±0.55 ^a	1.33±0.52 ^{af}	0.67±0.82 ^{afg}
HBO 2 d 组	6	2.00±0.89	3.33±0.52 ^{abcd}	2.33±0.82 ^{abcdf}	0.67±0.52 ^{afg}
HBO 7 d 组	6	2.50±0.55	4.00±0.00 ^{abede}	3.50±0.84 ^{abede}	1.83±0.75 ^{abdefg}
无 HBO 3 h 组	6	2.50±0.55	4.00±0.00	3.17±1.33	2.67±1.21
无 HBO 6 h 组	6	2.50±0.55	3.83±0.41	3.17±1.33	2.17±1.47
无 HBO 1 d 组	6	2.33±0.82	3.50±0.84	2.67±1.03	2.67±1.51
无 HBO 2 d 组	6	2.50±0.55	3.57±0.52	3.00±1.10	2.50±1.64
无 HBO 7 d 组	6	2.33±0.82	3.57±0.82	4.00±0.00	4.00±0.00

注:与同介入时间点的无 HBO 组比较,^a $P<0.05$;与 HBO 3 h 组比较,^b $P<0.05$;与 HBO 6 h 组比较,^c $P<0.05$;与 HBO 1 d 组比较,^d $P<0.05$;与 HBO 2 d 组比较,^e $P<0.05$;与组内治疗 10 d 后比较,^f $P<0.05$,与组内治疗 20 d 后比较,^g $P<0.05$

讨 论

本研究结果显示,HBO 组各亚组大鼠神经功能评分均较同一介入时间的无 HBO 组各亚组评分低,且各亚组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。该结果提示,HBO 可改善脑出血大鼠的神经功能损伤程度。研究表明,脑水肿是脑出血后神经元经受严重打击的中心环节及继发性脑损伤的标志,ICH 早期(24 h 内)脑水肿为细胞能量代谢障碍导致的细胞毒性脑水肿,而后期(24 h 后)则是血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)破坏所致的血管源性脑水肿,脑水肿的产生和发展是导致脑出血后神经功能缺损的关键因素,因此进行脑水肿的防治是临床上脑出血治疗的重点^[11]。有研究证实,HBO 治疗可减轻脑水肿,从而减轻大鼠神经功能缺损程度,但该研究还发现,由于早期脑出血大鼠血肿体积的增大会致使神经功能缺损严重,因此高压氧的治疗作用在短期内不足以纠正这么严重的神经功能缺损,需积累一定量,才能显现出明显的效果^[6]。

本研究结果还显示,HBO 3 h 组治疗 30 d 后其神经功能评分为(0.33±0.52)分,与组内治疗 10 d 和 20 d 后以及 HBO 7 d 组治疗 30 d 后比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),该结果提示,HBO 介入时间越早,疗程越长,大鼠神经功能评分越低,大鼠神经功能损伤越轻。HBO 改善神经功能缺损可能的机制如下:①HBO 可有效地提高脑出血后血肿周围缺血半暗带的氧供,增加线粒体有氧氧化的能力,减轻因无氧代谢增加产生的酸中毒,而改善脑的内环境,使 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性增高,降低脑血管的通透性,从而逆转神经细胞的损伤^[6];②HBO 可抑制 ICH 大鼠模型出血灶周围水通道蛋白-4(aquaporin protein-4)的表达,降低 AQP4 对血脑屏障的破坏作用,减轻出血灶周围脑水肿,从而促进神经功能的恢复^[6];③HBO 可通过增加氧在脑组织内的弥散距离、提高血氧分压、促进侧支循环建立以及减少脑血流量、降低颅内压等途径使水肿组织的氧供及血流灌注得到显著改善,阻断脑出血后脑缺氧-脑水肿-脑缺氧的恶性循环,从而降低出血灶周围脑组织的水含量^[12-13];④HBO 还可以通过促进血管新生相关因子蛋白的表达,从而促进血肿周围血管的再生,进而增加脑出血周围局部脑血流,改善脑组织及神经细胞的缺血缺氧,促进神经细胞的增殖与再生,增加脑血肿吸收,促进脑出血受损神经功能的恢复^[14]。

综上所述,早期、长疗程的 HBO 治疗可降低脑出血大鼠神经功能评分,促进神经功能的恢复,由此本课题组认为,HBO 对出血性脑血管疾病的预后及

转归具有重要影响,且在最佳介入时间开始足够疗程的 HBO 治疗可达到更好的疗效。

参 考 文 献

- [1] Calvert J W, Cahill J, Zhang JH. Hyperbaric oxygen and cerebral physiology [J]. *Neurol Res*, 2007, 29 (2): 132-141. DOI: 10.1179/016164107X174156.
- [2] Staykov D, Wagner I, Volbers B, et al. Natural course of perihemorrhagic edema after intracerebral hemorrhage [J]. *Stroke*, 2011, 42 (9): 2625-2629. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.618611.
- [3] Lei C, Lin S, Wu B, et al. Lipid levels are regionally associated with cerebral microbleeds in patients with intracerebral hemorrhage [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2014, 23 (5): 1195-1198. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.10.016.
- [4] He Y, Karabiyikoglu M, Hua Y, et al. Ischemic preconditioning attenuates brain edema after experimental intracerebral hemorrhage [J]. *Transl Stroke Res*, 2012, 3 (1): 180-187. DOI: 10.1007/s12975-012-0171-z.
- [5] 谢芹, 尤春景. 高压氧对实验性脑出血大鼠的治疗作用 [J]. *中国康复*, 2004, 19 (2).
- [6] 牛蕾蕾, 李红玲, 陈玉燕, 等. 不同介入时间高压氧治疗对实验性脑出血大鼠出血灶周围水肿及水通道蛋白-4 表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2014, 29 (9): 810-815. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2014.09.003.
- [7] 龚燕梅, 刘文斌, 孙晓萍, 等. 高压氧对急性脑出血患者脑源性神经营养因子及脑水肿和神经功能的影响 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2015, 32 (1): 60-63. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-4756.2017.05.036.
- [8] 程鹏玲, 于春丽, 宋闰宇, 等. 高压氧治疗对急性脑出血患者 BD-NF 脑水肿和神经功能的影响 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2016, 19 (6): 64-66.
- [9] 田亚楠, 范敬争, 李冠武, 等. SWI 评价大鼠脑出血模型血肿演变进展的试验研究 [J]. *中国中西医结合影像学杂志*, 2014, 12 (1). DOI: 10.3969/j.issn1672-0512.2014.01.005.
- [10] Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rat [J]. *Stroke*, 1989, 20 (10): 84-91.
- [11] Zhou W, Marinescu M, Veltkamp R. Only very early oxygen therapy attenuates posthemorrhagic edema formation and blood-brain barrier disruption in murine intracerebral hemorrhage [J]. *Neurocrit Care*, 2015, 22 (1): 121-132. DOI: 10.1007/s12028-014-0013-9.
- [12] Lin KC, Niu KC, Tsai iKJ, et al. Attenuating inflammation but stimulating both angiogenesis and neurogenesis using hyperbaric oxygen in rats with traumatic brain injury [J]. *J Trauma*, 2012, 72 (3): 650-659. DOI: 10.1097/TA.0b013e31823c575f.
- [13] Lim SW, Wang CC, Wang YH. Microglial activation induced by traumatic brain injury is suppressed by postinjury treatment with hyperbaric oxygen therapy [J]. *J Surg Res*, 2013, 184 (2): 1076-1084. DOI: 10.1016/j.jss.2013.04.070.
- [14] 张树新, 彭争荣, 闫斐, 等. 高压氧对脑出血大鼠脑内血管新生因子的影响研究 [J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2014, 21 (5): 306-311. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-6906.2014.05.005.

(修回日期: 2018-03-25)

(本文编辑: 阮仕衡)