

件,当从穿刺针套管或天线杆壁内走导线时,可最大限度减少其对微波作用场的干扰,但对于解决行多点凝固或较大区域内测温时的微波干扰问题目前尚无较好的解决方法,还需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Inversson K, Olsrud J, Stresson C, et al. Feedback interstitial diode laser (805nm) thermotherapy system ex vivo evaluation and mathematical modeling with one and four fibers. *Lasers Surg Med*, 1998, 22:86-96.
- 2 陈俊伟, 吕明德, 谢晓燕, 等. 改进经皮微波凝固治疗大肝癌技术的研究. *癌症*, 2001, 20:604-607.
- 3 Dong BW, Liang P, Yu XL, et al. Sonographically guided microwave coagulation treatment of liver cancer: an experimental and clinical study. *AJR*, 1998, 171:449-454.
- 4 王精兵, 冯敢生, 梁惠民, 等. 经皮微波凝固治疗恶性肝肿瘤的初步观察. *放射学实践*, 2003, 18:52-55.
- 5 Seki T, Wakabayashi M, Nakagawa T, et al. Percutaneous microwave coagulation therapy for patients with small hepatocellular carcinoma: comparison with percutaneous ethanol injection therapy. *Cancer*, 1999, 85:1694-1702.
- 6 Itamoto T, Asahara T, Kohashi T, et al. Percutaneous microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1999, 26:1841-1844.
- 7 Lu MD, Chen JW, Xie XY, et al. Hepatocellular carcinoma: US-guided percutaneous microwave coagulation therapy. *Radiology*, 2001, 221:167-172.
- 8 Asahara T, Nakahara H, Fukuda T, et al. Percutaneous microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma. *Hiroshima J Med Sci*, 1998, 47:151-155.
- 9 陈夷, 陈汉, 吴孟超, 等. 经皮微波热凝治疗肝癌的疗效观察. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24:65-67.
- 10 郑云, 吕明德, 陈俊伟, 等. 微波固化治疗肝癌抗肿瘤再生长的实验研究. *癌症*, 2000, 19:646-648.
- 11 Patterson EJ, Scudamore CH, Owen DA, et al. Radiofrequency ablation of porcine liver in vivo: effect of blood flow and treatment time on lesion size. *Ann Surg*, 1998, 227:559-565.
- 12 Sato M, Watanabe Y, Kashu Y, et al. Sequential percutaneous microwave coagulation therapy for liver tumor. *Am J Surg*, 1998, 175:322-324.
- 13 Murakami T, Shibata T, Ishida T, et al. Percutaneous microwave hepatic tumor coagulation with segmental hepatic blood flow occlusion in seven patients. *AJR*, 1999, 172:637-640.

(收稿日期:2004-04-20)

(本文编辑:易 浩)

· 研究快报 ·

亚低温对脑缺血再灌注大鼠的 ICAM-1 表达、MPO 活性和脑梗死体积的影响

叶心国 余绍祖 李承晏

近年来亚低温对脑缺血组织的保护作用已成为研究的热点,但亚低温对脑缺血再灌注损伤后炎症反应的影响未引起足够的重视。因此,我们观察了亚低温对实验大鼠脑缺血区的细胞间粘附分子(Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达、髓过氧化物酶(Myeloperoxidase, MPO)活性和脑梗死体积的影响,探讨亚低温在大鼠脑缺血病理损伤中的作用及其机制。

材料与方法

一、实验动物

由武汉大学医学院实验动物中心提供的健康雄性 SD 大鼠 130 只,鼠龄 2~3 个月,体重 200~300 g。随机分成 3 组:假手术组 10 只,常温组 60 只,亚低温组 60 只,其中后 2 组又根据观察时间点分为 6 个亚组,即缺血 3 h 再灌注 6, 12, 24, 48, 72 h 和 7 d 亚组,每亚组 10 只,亚低温组动物在缺血开始前即施行亚低温,当肛温达到 32~33℃后开始脑缺血过程,缺血结束后立即自然复温,常温组肛温均保持在 37℃左右。假手术组取脑缺血 3 h 再灌注 24 h 作为其观察时间点。

二、方法

1. 缺血再灌注动物模型的制备:采用改良线栓法建立可逆的大鼠左侧大脑中动脉线栓模型。按文献[1]的方法实施全身亚低温处理,术中及缺血期用电子温度计监测肛温,采用灯泡照射及热水袋升温、冰袋降温的方法使假手术组及常温组缺血期肛温稳定在 37℃左右。亚低温组缺血期间将冰块置于大鼠的头部、颈部、肩部及躯干两侧,使肛温保持在 32~33℃,当肛温低于 32℃时,应用 60 W 白炽灯照射大鼠躯干部以增温。缺血 3 h 后再灌注过程开始,撤去冰块及白炽灯,使体温自然恢复正常。成功的模型动物清醒后出现对侧肢体运动障碍,自发向对侧打转、同侧霍纳氏征,随时补充大鼠只数,保证每组各个时间观察点均有 10 只大鼠数量不变。

2. 标本及切片的制取及 ICAM-1 的测定:在缺血再灌注的不同时间点,随机选取 5 只大鼠,腹腔内注射 10% 水合氯醛(350 mg/kg 体重)深麻醉后,迅速打开胸腔,由左心耳灌注生理盐水 60 ml 快速冲洗,再用 10% 福尔马林内固定后断头取脑。标本浸于 10% 中性福尔马林内固定 72 h 后,自额极开始向后取冠状切片,石蜡包埋,最后在切片机上连续切片,片厚 3 μm,进行 ICAM-1 免疫组织化学染色(兔抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体及 SABC 免疫组化试剂盒均购于武汉博士德生物技术有限公司)。每只大鼠连续取 4 张切片,在 10×40 倍显微镜下分别随机选取缺血区内的 4 个视野,进行 ICAM-1 阳性微血管

基金项目:湖北省科技厅十五重点攻关项目资助(No. 2001AA307B)

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经内科

数计数。

3. MPO 活性测定:取缺血侧脑组织 100 mg 加 0.5% 十六烷三甲基溴化铵 (Heradecyle Trimethyle Ammonium Bromide, HTAB) 2 ml, 用超声粉碎脑组织匀浆 (30 s, 3 次), 0~4℃ 10 000 转离心 15 min, 取上清液 0.1 ml 加 2.9 ml 反应液 (0.167 mg/ml 邻联茴香胺的磷酸缓冲液和 0.000 5% 过氧化氢), 保持温度 25℃, 于分光光度计 460 μm 波长下立即进行 2 min 扫描, 以第 30~90 s 的 1 min 内吸光度的变化代表酶活力的改变。1 单位 MPO 活力以 25℃ 时分解 1 μmol H₂O₂ 来表示。

4. 脑梗死体积的测定:各组大鼠届时断头取脑, 取出的脑组织立即置 -20℃ 冰箱保存 20 min, 然后放入切脑模具中间隔 1 mm 连续冠状切片, 再将脑片放入 2% 氯化三苯四氮唑 (TTC) 磷酸盐缓冲液中, 37℃ 恒温避光孵育 30 min, 正常脑组织染成红色, 梗死灶为白色。利用多媒体彩色图文分析系统自动测量出照片上每一个梗死灶的面积和该层面的总面积, 再乘以片厚, 即得全脑梗死灶体积。

三、统计学分析

各项检测结果以 ($\bar{x} \pm s$) 记录, 采用 SPSS 12.0 统计软件在微机上进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

从表 1 可见常温组再灌注 6 h, 缺血侧脑组织中可见到 ICAM-1 表达阳性微血管数和 MPO 活性增高, 48 h 达到高峰, 再灌注 7 d 仍保持一定水平的表达, 与假手术组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 亚低温组 ICAM-1 表达和 MPO 活性也较假手术组明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与常温组比较, 亚低温组各观察时间点 ICAM-1 表达阳性微血管数和 MPO 活性均较相同时间点常温组明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.01$)。常温组在再灌注 6 h 即可看到明显梗死灶, 随再灌注时间的延长梗死体积逐渐增大, 而亚低温组各观察时间点梗死体积明显小于常温组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 脑缺血再灌注后 ICAM-1 阳性血管数目、MPO 活性和梗死灶体积的动态变化 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	ICAM-1 血管数 (条/4 个视野)	MPO 活性 (mU/100 mg 湿组织)	梗死灶体积 (mm ³)
假手术组	10	1.43 ± 0.76	1.12 ± 0.18	0
常温组	60			
6 h	10	19.51 ± 3.93 [#]	1.50 ± 0.12 [*]	29.12 ± 11.38 [*]
12 h	10	27.60 ± 6.34 [#]	2.31 ± 0.25 [#]	49.05 ± 14.45 [#]
24 h	10	39.17 ± 3.04 [#]	4.98 ± 0.30 [#]	85.11 ± 12.59 [#]
48 h	10	46.36 ± 3.38 [#]	5.63 ± 0.19 [#]	121.34 ± 11.72 [#]
72 h	10	29.11 ± 1.96 [#]	4.63 ± 0.16 [#]	124.79 ± 13.46 [#]
7 d	10	14.98 ± 2.31 [#]	3.37 ± 0.23 [#]	131.67 ± 6.23 [#]
亚低温组	60			
6 h	10	5.92 ± 1.75 ^{* ☆}	1.23 ± 0.20 [△]	12.76 ± 8.48 ^{* △}
12 h	10	12.25 ± 2.73 ^{* ☆}	1.38 ± 0.13 ^{* ☆}	31.18 ± 8.67 ^{* △}
24 h	10	14.01 ± 3.96 ^{* ☆}	2.23 ± 0.16 ^{* ☆}	43.41 ± 9.30 ^{* ☆}
48 h	10	16.44 ± 3.45 ^{* ☆}	2.91 ± 0.14 ^{* ☆}	60.15 ± 11.84 ^{* ☆}
72 h	10	10.54 ± 2.08 ^{* ☆}	2.74 ± 0.22 ^{* ☆}	85.05 ± 15.63 ^{* ☆}
7 d	10	5.39 ± 1.81 ^{* ☆}	1.89 ± 0.14 [☆]	93.05 ± 6.34 ^{* ☆}

注:与假手术组比较, $^* P < 0.05$, $^# P < 0.01$; 与常温组比较, $^△ P < 0.05$, $^☆ P < 0.01$

讨 论

一、脑缺血再灌注脑组织的炎症反应及脑损伤

脑缺血再灌注可加重缺血损伤, 缺血区的炎症反应是再灌注损伤的重要机制之一, 而 ICAM-1 在缺血再灌注损伤后的炎症反应中起关键作用^[2]。本研究中假手术组仅见少许 ICAM-1 阳性表达, 而缺血后再灌注 6 h 即有较多 ICAM-1 阳性表达, 再灌注 48 h 达高峰, 再灌注 7 d 仍保持一定水平的表达。说明脑缺血刺激了 ICAM-1 阳性微血管数的增加, 启动粘附因子表达, 促进炎症细胞进一步粘附并透过内皮细胞膜进入脑组织, 加重脑损伤^[3]。

参与脑缺血后损伤反应的炎症细胞, 早期以中性粒细胞为主, MPO 主要位于中性粒细胞的颗粒中, 其活性可作为组织内中性粒细胞浸润的定量指标。本实验采用生化方法测定能够反映组织白细胞数量的 MPO 活性, 结果显示缺血再灌注后 6 h 脑组织中 MPO 活性开始升高, 48 h 达高峰, 7 d 时 MPO 活性仍高于假手术组, 提示在缺血再灌注后 6 h 缺血脑组织已经有了明显中性粒细胞粘附、聚集, 炎症反应在再灌注后 2~3 d 达高峰。这些研究表明中性粒细胞参与并造成了脑缺血早期炎症性神经损害^[4]。

二、亚低温对缺血再灌注脑组织中炎症反应的影响和对脑的保护作用

动物实验和临床观察揭示, 亚低温能显著抑制炎症细胞在缺血区血管内的聚集和粘附, 以及随后在缺血区脑实质内的浸润, 尤其是在缺血周边区内的浸润, 从而阻断炎症级联反应, 起到脑保护作用^[5]。Deng 等^[6]用大鼠制成大脑中动脉栓塞模型, 缺血 2 h 立即给予亚低温, 同对照组相比, 缺血 1 d 后, 缺血亚低温组 ICAM-1 降低 51%, 缺血 3 d 后, ICAM-1 减少 91%。本实验中, 选择亚低温作为干预手段, 观察了亚低温对缺血再灌注后 ICAM-1 的表达和 MPO 活性影响, 结果表明, 各个观察时间点, 亚低温组的 ICAM-1 阳性微血管数和 MPO 的活性均较常温组明显减少或降低, 差异有统计学意义。提示亚低温能明显抑制大鼠脑缺血再灌注后的白细胞聚集, 阻断了 ICAM-1 过度表达, 从而使白细胞聚集浸润减少, 抑制炎性细胞因子的产生, 起到脑保护作用。有人认为这可能与亚低温抑制炎性介质的释放、降低血脑屏障通透性、减轻脑水肿及清除氧自由基等有关^[7]。

我们的实验还发现缺血组在再灌注 6 h 即出现梗死灶, 随再灌注时间的延长, 梗死体积逐渐增大, 通过亚低温的干预, 在各个相应时间点, 亚低温组的梗死体积明显较常温组小。推测亚低温可能是通过减少 ICAM-1 的表达和相关细胞因子的释放, 抑制白细胞的浸润, 减轻脑组织半暗带区的炎症反应, 从而起到脑保护作用而缩小梗死体积的。

总之, 脑缺血再灌注后脑组织局部过度的炎症反应是造成再灌注损伤的主要原因之一, 阻断再灌注后的炎症级联反应是改善缺血后脑损伤的理想策略, 亚低温不同程度地阻断了这一过程, 可能是其发挥脑保护作用的重要机制之一。

参 考 文 献

- 1 刘志超, 李承晏, 董红娟, 等. 亚低温对大鼠急性脑梗死后脑组织内

- Ca²⁺、Mg²⁺、EAA 及血浆 ET 变化的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25: 662-664.
- 2 李力仙, 杨忠. 粘附分子与脑缺血再灌注损伤. 国外医学免疫学分册, 2003, 26: 132-134.
 - 3 吴桂昌, 陆雪芬, 徐恩. 亚低温对大鼠脑缺血再灌注后炎症反应的作用研究. 中风与神经疾病杂志, 2004, 21: 434-436.
 - 4 王知秋, 陈衍城, 杨国源, 等. 小鼠局灶性脑缺血后 ICAM-1、Mac-1 和 MPO 活性的变化. 复旦大学学报(医学版), 2003, 30: 304-307.
 - 5 Wang GJ, Deng HY, Maier CM, et al. Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/monocyte accumulation

following experimental stroke. Neuroscience, 2002, 114: 1081-1090.

- 6 Deng H, Han HS, Cheng D, et al. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. Stroke, 2003, 34: 2495-2501.
- 7 赵瑞波, 李宗敏. 亚低温对脑缺血再灌注损伤的保护作用. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 2004, 24: 223-226.

(修回日期: 2005-03-17)

(本文编辑: 熊芝兰)

超早期亚低温对兔心肺复苏后的脑保护作用

魏捷 李玲莉 朱珊珊 李涛

心肺复苏后早期亚低温具有脑保护作用, 以往多采用冰帽和冰敷进行体表降温, 但达到亚低温的时间较长, 能否采用其他方式形成超早期亚低温, 超早期亚低温是否具有更好的脑保护作用, 本研究通过动物模型实验对此进行了探讨。

材料与方法

一、模型制作

家兔 20 只, 雌雄各半, 体重 2.5 ~ 3.0 kg, 随机分为超早期亚低温组(A 组)和常规体表降温组(B 组), 每组 10 只。术前 12 h 开始禁食水, 耳缘静脉推注氯胺酮 10 mg/kg 体重、肝素 100 U/kg 体重。麻醉后固定, 行颈部正中切口, 暴露气管和右侧颈总动脉及耳动脉分支, 结扎耳动脉支远离颈总动脉端, 剪断。切开右侧腹股沟处皮肤, 暴露股动脉。切开气管并插管, 用呼吸机辅助呼吸, 潮气量为 15 ml/kg, 频率为 30 次/min。右侧股动脉穿刺, 插入套管针, 连接监护仪监测平均动脉压(mean arterial pressure, MAP), 并将套管针固定在皮肤上, 然后缝合皮肤, 同时监测心电图(ECG)。肛温计插入肛门内 5 cm 监测直肠温度。停止机械通气, 经胸用 70 V 交流电进行为时 5 s 的体外电刺激, 必要时反复, 直至 ECG 显示室颤、MAP 降至 20 mmHg, 且持续 5 min 后, 应用肾上腺素开始复苏, 必要时加用利多卡因和除颤, ECG 呈自主心率, MAP > 80 mmHg 为自主循环恢复。所有动物均在 3 min 内完成复苏。

二、亚低温处理

降温标准为 33℃; 维持时间为 24 h。A 组: 采用体外血液冷却降温, 将输液管连接成一 5 m 长的导管, 一端接 4 号半针头, 另一端预留接套管针的接头, 预先用肝素冲洗抗凝, 4 号半针头穿刺耳动脉残端, 另一端接右股动脉套管针的另一个接口上, 中间用输液泵控制流速。将导管放置在 4℃ 的水槽中, 水槽中加入冰块维持水槽温度, 从而让血液从股动脉流出, 冷却后以每千克体重 5 ml/min 的速度经耳动脉残端流入颈总动脉。待肛温降至 33℃ 时结扎耳动脉近颈总动脉端, 撤掉导管, 体表以

冰敷维持。B 组: 采用体表冰敷。2 组动物均在血压和心率稳定后 15 min 缝合颈部皮肤, 清醒后可拔除气管插管。

三、疗效评估

所有动物在 24 h 后进行总体情况分类(Overall Performance Category, OPC)评定和神经功能缺损评分(NDS)^[1]。总体情况分类评估标准为: ①正常; ②中度功能不全; ③严重功能不全, 但意识清楚; ④昏迷。NDS 评估标准见附录^[2]。

组织病理学损害评分(Histopathologic Damage Score, HDS)评估方法: 所有动物在第 72 小时处死并迅速取脑, 石蜡包埋, 冠状切片, 每层 2 mm, 分别取双侧共 10 个部位评定 HDS。对每个主要解剖区域在 40 ~ 400 倍显微镜下观察: ①水肿; ②缺血性神经元改变; ③梗死, 并按严重程度分为极轻(1+)、轻(2+)、中(3+)、重(4+)和无改变(0), 按缺血性神经元改变乘 2, 梗死乘 4 的方法, 计算该区域的 HDS, 各区域 HDS 的和为总 HDS。

四、统计学分析

所得数据以($\bar{x} \pm s$)显示。计量资料采用 *t* 检验, 等级资料采用秩和检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、肛温

心肺复苏前、后, A 组肛温分别为 37.9℃, 37.6℃; B 组分别为 38.1℃, 37.7℃。与本组治疗前比较, 差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。A 组在心肺复苏后下降到 33℃ 的时间为 (8.3 ± 3.2) min, B 组在心肺复苏后下降到 33℃ 的时间为 (86.3 ± 13.9) min, 差异有统计学意义(*F* = 9.716, *P* < 0.01), 详见图 1。

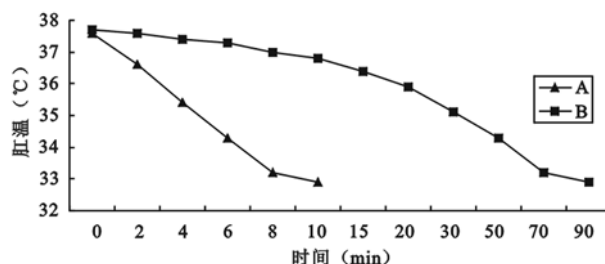


图 1 2 组心肺复苏后的肛温水平

基金项目: 武汉市晨光计划资助(No. 20055003059-13)

作者单位: 430060 武汉, 武汉大学人民医院急诊科(魏捷、李玲莉), 康复医学科(朱珊珊), 神经内科(李涛)