

· 研究简报 ·

脑缺血后立即高压氧治疗对脑缺血再灌注损伤大鼠脑梗死体积的影响

冯娟娟 何予工 梁维娣 丁晓伟 张志强

【摘要】目的 观察脑缺血后立即给予单次高压氧(HBO)治疗对脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积的影响。**方法** 选取45只SD雌性大鼠采用Longa线栓法制备局灶性脑缺血再灌注损伤模型,将制模成功的42只大鼠按随机数字表法分为HBO治疗组、高压空气组和缺血对照组,每组14只大鼠。HBO治疗组立即单次给予HBO治疗(2.0 ATA,110 min)干预;高压空气组则给予与HBO治疗组同样处理,但不供氧;缺血对照组不做任何特殊处理,大鼠在脑缺血后常温常压下呼吸空气。3组大鼠分别于脑梗死后8 h断头取脑组织,冷冻、切片、染色、固定后,测量各切片梗死灶面积和全脑面积,根据脑梗死体积/全脑体积计算梗死灶体积所占百分比的方法检测梗死灶体积的变化。**结果** HBO治疗组、高压空气组及缺血对照组大鼠的脑梗死体积百分比分别为 $(5.90 \pm 2.92)\%$ 、 $(16.27 \pm 4.83)\%$ 和 $(15.00 \pm 7.71)\%$,HBO治疗组较缺血对照组及高压空气组大鼠脑梗死体积百分比明显减小($P < 0.05$),高压空气组与缺血对照组大鼠脑梗死体积百分比相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 脑缺血后立即给予单次110 min HBO治疗能明显减小局灶性脑缺血再灌注大鼠的梗死灶体积。

【关键词】 高压氧; 脑缺血再灌注; 大鼠; 梗死体积

脑组织缺氧是局灶性脑缺血后直接或间接发生细胞损伤的一个主要原因^[1]。脑组织缺血后,超过再灌注时窗^[2]恢复血供,又会发生再灌注损伤,称其为缺血再灌注损伤^[3]。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗缺血性脑血管疾病,是以高压生理学及医学基本原理为基础,通过增加组织储氧量而提高组织的有氧代谢^[4]、改善微循环而减轻脑水肿、减少延迟性一氧化氮(nitric oxide, NO)产生导致的脑缺血再灌注损伤^[5]以及减少脑神经细胞凋亡、保护脑神经^[6]等机制达到临床治疗效果。但HBO治疗在某些方面还存在争议^[7]。较多研究认为,早期治疗能起到脑保护作用,可减轻自由基的损伤^[8]。Badr等^[9]和Lou等^[10]研究亦发现,脑缺血后6 h内应用HBO治疗有明显效果,而对于脑梗死后更早期(立即)给予HBO治疗的相关研究目前鲜见报道。本研究采用大脑中动脉闭塞再灌注(middle cerebral artery occlusion reperfusion, MCAO/R)模型大鼠,观察脑缺血后立即给予单次HBO治疗对脑缺血再灌注大鼠梗死体积的影响,旨在探讨脑缺血后更早期单次HBO治疗对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠脑梗死的治疗效果,为临床上治疗缺血性脑血管疾病(ischemic cerebrovascular disease, ICVD)进一步提供理论依据。

材料与方法

一、实验动物及仪器和试剂

1. 实验动物:健康清洁级Sprague-Dawley(SD)雌性大鼠45只,体重200~260 g,由中国医科大学附属盛京医院实验动物中心和中国医科大学实验动物中心提供。

2. 仪器和材料:HBO治疗设备(GY3200-烟台宏远氧业有限公司)、手术器械、手动切片器、显微镜、HZS-H水浴振荡器、-20℃冰箱、鱼线、尼康NIS-Elements BR3.0基础研究图像分析软件。

3. 试剂:10%的水合氯醛、10%的2,3,5-三苯基氯化四氮唑磷酸缓冲液、10%多聚甲醛液。

二、局灶性脑缺血再灌注模型制备及实验动物分组

1. 术前准备:①大鼠在室温20~25℃的安静环境下饲养24 h以上,术前禁食12 h,不禁水;②采用直径约0.261 mm的市售尼龙鱼线,每段长度约5 cm,插入端在显微镜下用细砂纸磨成光滑圆头状,乙醇消毒后浸入生理盐水中备用;③每只动物称重后,按350 mg/kg体重的剂量,用10%水合氯醛腹腔注射全身麻醉。

2. 手术步骤:参考Longa等^[11]建立MCAO/R模型的方法,大鼠全麻后,仰卧固定于手术台上,取颈部正中切口,剪开浅筋膜,分离二腹肌、胸锁乳突肌和肩胛舌骨肌之间的肌间隙,暴露右侧的颈总动脉(commom carotid artery, CCA)和迷走神经,再逐步依次分离暴露颈总动脉分叉部、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA),在CCA远心端和近心端及ECA处挂线备用。用微动脉夹暂时夹闭ICA,然后结扎近心端CCA及ECA。在距CCA分叉处约4 mm处剪一小口,将栓线插入到ICA,从CCA分叉处计算,插入深度约17~20 mm(栓线预先在18 mm处有黑色标记)微遇阻力时立即停止,然后结扎CCA远心端丝线固定栓线防止脱落,缝合皮肤,将栓线尾部略露出皮肤,缝线略作固定。手术完毕后让大鼠自然清醒。在栓线置入后2 h由露出皮肤的栓线尾部将栓线柔和缓慢地抽出形成再灌注模型。

3. 分组:制备局灶性脑缺血再灌注模型过程中,有3只造模失败,予以剔除,将制模成功的42只大鼠采用随机数字法分为HBO治疗组、高压空气组和缺血对照组,每组14只。

三、治疗方法

HBO治疗组于造模成功后立即给予单次HBO治疗干预;

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.02.017

基金项目:辽宁省教育厅项目(05L569)

作者单位:450052 郑州,郑州大学第一附属医院康复医学科(冯娟娟、何予工);中国医科大学附属盛京医院康复中心(张志强、梁维娣);沈阳医学院奉天医院康复医学科(丁晓伟)

通信作者:张志强, Email:zhangzq@sj-hospital.org

高压空气组给予与 HBO 治疗组同样处理,但不供氧;缺血对照组大鼠在脑缺血后常温常压下呼吸空气,不做任何特殊处理。

1. 吸氧前准备:HBO 治疗组大鼠术后立即将其装入容积为 500 ml 大小的塑料瓶内(瓶子的容积不能过大,防止动物掉头而不能充分吸入纯氧),头部朝向瓶口端,闭合瓶底时留一小口以便动物呼出的气体排出。

2. HBO 治疗方案:进舱后,塑料瓶口与 100% 纯氧气管口紧密相接,匀速加压 20 min 至 2.0 ATA(1 ATA = 100 kPa),维持该压力 70 min,其间停止供氧 2 次,每次 5 min,吸氧完毕,在 20 min 内匀速减至常压,总治疗时间为 110 min。

四、神经功能评分

依据 Longa 等^[11]的 5 级 4 分法评分标准评定大鼠神经功能缺损情况:0 分为无神经缺损症状;1 分为不能完全伸展左侧前爪;2 分为自主运动时身体向左侧划圈;3 分为身体向左侧倾倒;4 分为不能自主行走并伴有意识障碍。对各组大鼠均于脑梗死 8 h 进行神经功能缺损评分,将身体向左侧划圈或行走时向左侧倾倒者,即符合上述评分为 2~3 级者,列为研究对象。

五、脑梗死灶体积计算

各组大鼠于脑梗死 8 h 神经功能缺损评分完成后,用 10% 水合氯醛深麻醉,断头处死,迅速取脑,将脑组织置于 -20 ℃ 冰箱中冷冻 30 min 后,自额极至大脑小脑裂间隔 2 mm 连续做 6 个冠状切片,并用 10% 红四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)磷酸缓冲液在 37 ℃ 振荡水浴染色 30 min,正常组织染成红色,缺血坏死组织为苍白色,经 10% 甲醛溶液固定后摄像,用尼康 NIS-Elements BR3.0 基础研究图像分析软件测量各切片梗死灶面积和全面积。以脑梗死体积/全脑体积计算的梗死灶体积所占百分比作为统计参数,采用单盲法,即盲图像分析者,按公式(1)计算脑梗死灶体积及全脑体积^[12]:

$$V = t_1(A_1 + A_2)/2 + t_2(A_2 + A_3)/2 + \cdots + t_{n-1}(A_{n-1} + A_n)/2 \quad (1)$$

其中 V 为体积, t 为两相邻冠状面的间距, A 为每一冠状面上梗死灶面积, n 为冠状面序列号。

本研究最终剔除了不符合神经评分标准、处死前意识状态较差、取脑后有颅内出血、经 HBO 治疗后梗死灶消失或再灌注后自愈和苍白梗死区过小或过大的大鼠。最终完成本实验研究的大鼠分别有 HBO 治疗组 7 只、高压空气组 6 只和缺血对照组 6 只。

六、统计学分析

使用 SPSS 11.5 版软件进行统计学处理,所有资料用($\bar{x} \pm s$)表示,各组均数间比较用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

经 110 min 相应的干预治疗后, HBO 治疗组、高压空气组和缺血对照组大鼠脑梗死体积所占全脑体积的百分比分别为 $(5.90 \pm 2.92)\%$ 、 $(16.27 \pm 4.83)\%$ 和 $(15.00 \pm 7.71)\%$ 。HBO 治疗组大鼠梗死体积百分比显著低于高压空气组和缺血对照组大鼠梗死体积百分比($P < 0.05$);高压空气组与缺血对照组大鼠梗死体积百分比相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠干预后脑梗死灶体积百分比比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	脑梗死灶体积百分比
HBO 治疗组	7	5.90 ± 2.92
高压空气组	6	16.27 ± 4.83^{ab}
缺血对照组	6	15.00 ± 7.71^a

注:与 HBO 治疗组比较, $^aP < 0.05$;与缺血对照组比较, $^bP > 0.05$

讨 论

目前, HBO 治疗作为一种无创疗法对脑缺血再灌注损伤的疗效已得到医学上的肯定^[13-16]。有研究表明,广泛脑皮质及皮质下梗死早期有血管再灌注采用 HBO 治疗有效,临床上 HBO 疗法应与溶栓疗法配合治疗缺血性疾病^[17];亦有研究证实 HBO 疗法对于永久性脑缺血无明显的效果^[10];但有些临床治疗及动物基础研究证明, HBO 在 ICVD 的疗效方面还存在一些争议。

治疗时间的长短和治疗压力的大小是一个明显原因。航海和高压医学学会推荐 HBO 治疗压力应在 2.4~3.0 ATA, 避免氧性抽搐等毒性作用^[18]。目前临床治疗压力多在 1.5~3.0 ATA, 治疗持续时间多为 60 min^[19]。疗程为单次, 治疗时间为连续 2~10 d 的也有个别报道^[20]。本实验采取 1 个大气压下、单次、60 min 的治疗, 实验结果表明该治疗时间长短和治疗压力是可行的。

有研究表明, HBO 疗法可减轻脑缺血再灌注后半暗带的神经元损伤, 但疗效与治疗时机有关^[9]。脑缺血后 6 h 内给予 HBO 治疗, 可有效地减少早期脑皮质区和海马 CA1 区神经元的丢失和显著改善大鼠远期的感觉运动功能和记忆功能, 而缺血 12 h 以后给予 HBO 治疗, 治疗效果不明显^[21], 这与 Badr 和 Lou 等^[9-10]的研究一致, 提示 HBO 治疗的最佳时间为发病 6 h 内, 在条件许可的情况下, 应尽早行 HBO 治疗。Chang 等^[22]在短暂脑缺血后立即给予 2 次、1.5 h、3.0 ATA 的 HBO 治疗, 发现脑梗死体积明显减小; Sunami 等^[4]在永久性脑缺血后立即给予 1 次、2.0 h、3.0 ATA 的 HBO 治疗, 也发现脑梗死体积的减小。但 Hjelde 等^[23]在永久性脑缺血后立即给予 1 次、1.0 h、2.0 ATA 的 HBO 治疗, 结果显示并未降低脑梗死灶体积。

本研究采用 MCAO/R 模型, 于大鼠脑缺血后立即给予 HBO 干预(2.0 ATA, 1 次, 110 min), 并于脑缺血 8 h 取脑和测量脑梗死灶体积的大小, 结果显示, HBO 治疗组大鼠脑梗死体积分别与高压空气组和缺血对照组相比, 脑梗死体积有明显减小($P < 0.05$), 而高压空气组与缺血对照组相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 推测这种超早期立即给予 HBO 治疗可使大鼠脑组织刚出现缺血就立即得到 HBO 干预, 显著地提高了动脉血氧分压及脑组织的氧张力, 增加了椎-基底动脉血流量, 打断了脑缺血-脑水肿的恶性循环, 使脑缺氧缺血在一定程度上得以缓解, 保持了一种相对正常的能量代谢过程, 降低了因缺血缺氧所致的脑组织的损伤。由于脑缺血时大部分血流由毛细血管血流构成, 故较高的血浆氧浓度可能产生了重要作用^[24]。

本研究可能会对临床上治疗 ICVD 提供一些方向, 但 HBO 治疗对缺血再灌注损伤作用机制存在双重性、复杂性, 需要进一步的基础实验研究加以探索、研究和验证, 同时也需要临床大样本实验予以证实。

参 考 文 献

- [1] Siesjo BK, Kristian T, Katsura KI. Overview of bioenergetic failure and metabolic cascades in brain ischemia [M]. In: Gynsberg MD, Bogousslavsky J, ed. Cerebrovascular Disease. Oxford: Blackwell, 1998: 3-13.
- [2] Pulsinelli WA, Jacewicz M, Levy DE, et al. Ischemic brain injury and the therapeutic window [J]. Ann N Y Acad Sci, 1997, 835 (1): 187-193.
- [3] Yamato M, Shiba T, Yamada K, et al. Separable detection of lipophilic and hydrophilic phase free radicals from the ESR spectrum of nitroxyl radical in transient MCAO mice [J]. Free Radic Res, 2009, 43 (9): 844-851.
- [4] Sunami K, Takeda Y, Hashimoto M, et al. Hyperbaric oxygen reduces infarct volume in rats by increasing oxygen supply to the ischemic periphery [J]. Crit Care Med, 2000, 28 (8): 2831-2836.
- [5] 王国忠, 赵立明, 高春锦, 等. 高压氧对脑缺血再灌注大鼠的海马诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26 (4): 193-195.
- [6] 蒋杞英, 霍本良. 高压氧对大鼠局灶性脑缺血再灌注 caspase-3 表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28 (12): 853-855.
- [7] Nighoghossian N, Trouillas P. Hyperbaric oxygen in the treatment of acute ischemic stroke: an unsettled issue [J]. J Neurol Sci, 1997, 150 (1): 27-31.
- [8] Eschenfelder CC, Krug R, Yusufi AF, et al. Neuroprotection by oxygen in acute transient focal cerebral ischemia is dose dependent and shows superiority of hyperbaric oxygenation [J]. Cerebrovasc Dis, 2008, 25 (3): 193-201.
- [9] Badr AE, Yin W, Mychaskiw G, et al. Dual effect of HBO on cerebral infarction in MCAO rats [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001, 280 (3): R766-R770.
- [10] Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, et al. Therapeutic Window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats [J]. Stroke, 2004, 35 (2): 578-583.
- [11] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20 (1): 84-91.
- [12] O'Donnell ME, Tran L, Lam TI, et al. Bumetanide inhibition of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter reduces edema formation in the rat middle cerebral artery occlusion model of stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24 (9): 1046-1056.
- [13] Li JS, Zhang W, Kang ZM, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury by inhibition of apoptosis via mitochondrial pathway in rat brain [J]. Neuroscience, 2009, 159 (4): 1309-1315.
- [14] Baynosa RC, Naig AL, Murphy PS, et al. The effect of hyperbaric oxygen on NOS activity and transcription in ischemia reperfusion injury [J]. J Am Coll Surgeons, 2005, 201 (3): s57-58.
- [15] Wang YC, Zhang S, Du TY, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury by stimulating autophagy in neurocyte [J]. Brain Res, 2010, 1323 (1): 149-151.
- [16] He XZ, Xu XL, Fan M, et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen induces tolerance against renal ischemia-reperfusion injury via increased expression of heme oxygenase-1 [J]. J Surg Res, 2011, 170 (2): e271-e277.
- [17] Veltkamp R, Sun L, Herrmann O, et al. Oxygen therapy in permanent brain ischemia: potential and limitations [J]. Brain Res, 2006, 1107 (1): 185-191.
- [18] Chavko M, Braisted JC, Outsa NJ, et al. Role of cerebral blood flow in seizures from hyperbaric oxygen exposure [J]. Brain Res, 1998, 791 (1-2): 75-82.
- [19] Helms AK, Whelan HT, Torbey MT. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia [J]. Cerebrovasc Dis, 2005, 20 (6): 417-426.
- [20] Conconi MT, Baiguera S, Guidolin D, et al. Effects of hyperbaric oxygen on proliferative and apoptotic activities and reactive oxygen species generation in mouse fibroblast 3T3/J2 cell line [J]. J Invest Med, 2003, 51 (4): 227-232.
- [21] 刘晓红, 赵永利, 马巧梅, 等. 高压氧干预大鼠缺氧缺血性脑损伤的时间窗研究 [J]. 中华儿科杂志, 2006, 44 (3): 177-181.
- [22] Chang CF, Niu KC, Hoffer BJ, et al. Hyperbaric oxygen therapy for treatment of post ischemic stroke in adult rats. Exp Neurol, 2000, 166 (2): 298-306.
- [23] Hjelde A, Hjelstuen M, Haraldseth O, et al. Hyperbaric oxygen and neutrophil accumulation/tissue damage during permanent focal cerebral ischemia in rats [J]. Eur J Appl Physiol, 2002, 86 (5): 401-405.
- [24] Theilen H, Schroeck H, Kuschinsky W, et al. Gross persistence of capillary plasma perfusion after middle cerebral artery occlusion in the rat brain [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1994, 14 (6): 1055-1061.

(修回日期: 2013-12-28)

(本文编辑: 汪 玲)

· 消息 ·

《中华物理医学与康复杂志》征订启事

《中华物理医学与康复杂志》是中华医学会主办的物理医学与康复(康复医学)专业的高水平学术期刊。本刊严格贯彻党和国家的卫生工作方针政策,本着理论与实践相结合、提高与普及相结合的原则,积极倡导百花齐放、百家争鸣;全面介绍物理治疗、物理医学与康复领域内领先的科研成果和新理论、新技术、新方法、新经验以及对物理因子治疗、康复临床、疗养等有指导作用,且与康复医学密切相关的基础理论研究,及时反映我国康复治疗、物理医学与康复、康复医学的重大进展;同时密切关注国际康复医学发展的新动向,促进国内外物理治疗、物理医学与康复的学术交流。

《中华物理医学与康复杂志》为月刊,大 16 开,内芯 80 页码,中国标准刊号:ISSN 0254-1424 CN 42-1666/R,邮发代号:38-391,每月 25 日出版;2014 年每册定价 20 元,全年 240 元整。热忱欢迎国内外物理治疗、物理医学与康复、康复医学领域以及神经内科、神经外科、骨科等相关科室的各级医务工作者踊跃订阅、投稿。订购办法:①邮局订阅:按照邮发代号 38-391,到全国各地邮局办理订阅手续。②直接订阅:通过邮局汇款至《中华物理医学与康复杂志》编辑部订购,各类订户汇款时务请注明所需的杂志名称及年、卷、期、册数等。

编辑部地址:430030 武汉市解放大道 1095 号同济医院内《中华物理医学与康复杂志》编辑部;电话:(027) 83662874;传真:(027) 83663264;E-mail:cjpmr@tjh.tjmu.edu.cn;杂志投稿网址:www.cjpmr.cn。