

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.26.006

动脉灌注脑低温治疗大鼠大面积脑梗死的实验研究*

万 勇, 陈 东

(广东省深圳市人民医院神经外科 518020)

[摘要] 目的 探讨动脉灌注脑低温治疗大鼠大面积脑梗死的效果。方法 32 只大鼠被分成:模型组、冰帽组、全身低温组和颈内动脉的冷盐水灌注(ICSI)组。再灌 48 h 后,进行神经行为学评分;检测脑含水量及脑梗死体积。结果 各低温方式均能降低大鼠梗死体积,ICSI 组脑梗死体积分别与全身低温组、冰帽组及模型组比较,差异均有统计学意义($t=8.37, 5.31, 11.47, P<0.05$)。ICSI 组与冰帽组、全身低温组比较,脑含水量差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。ICSI 组与模型组、冰帽组、全身低温组比较,24、48 h 神经行为学评分差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。ICSI 组的 24 h 与 48 h 神经行为学评分差异具有统计学意义($t=6.06, P<0.05$)。结论 ICSI 可以显著减少局灶性脑缺血后梗死体积及脑含水量,促进神经功能的恢复。

[关键词] 脑梗死;脑水肿;颈内动脉;冷盐水灌注

[中图分类号] R604

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)26-3619-03

Experimental study on tricarotid cold saline infusion for treatment of malignant cerebral ischemia in rats*

Wan Yong, Chen Dong

(Department of Neurosurgery, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of tricarotid cold saline infusion for treatment of malignant cerebral ischemia in rats. **Methods** A total of 32 rats were randomly divided into four groups: model group, cap group, systemic hypothermia group and ICSI group. After 48 h reperfusion, we recorded the neurological behavior score, brain water content and infarct volume. **Results** Compared with systemic hypothermia group, cap group, model group and ICSI group all showed significantly reduced infarct size. There was statistically significant difference among ICSI group and others ($t=8.37, 5.31, 11.47, P<0.05$). There was statistically significant difference among ICSI group and others in brain water content ($P<0.05$). There was statistically significant difference among ICSI group and others in neurological behavior score ($P<0.05$). There was significant difference between 24 h and 48 h neurological behavior score of ICSI group ($t=6.06, P<0.05$). **Conclusion** ICSI can significantly reduce after focal cerebral ischemia and infarct volume and brain water content, promote the recovery of neurological function.

[Key words] brain infarction; brain edema; internal, carotid artery; cold saline infusion

脑梗死是临床常见的脑血管病之一,最常见的是大脑中动脉梗死,如果治疗不及时患者病死率很高,严重影响患者的生存质量及预后。因此,怎样更好的防止大面积脑梗死的加剧,保存缺血区的神经功能以提高患者的生存质量是急需解决的问题^[1]。“治疗性低温”是目前疗效确切的保护脑功能的方法。目前常见的低温措施有冰帽、全身低温等,但这些方式各有优缺点。颈内动脉的冷盐水灌注(intracarotid cold saline infusion, ICSI)是目前研究的热点,研究提示这种方式是安全可行的^[2]。本研究通过比较不同低温方式对脑梗死大鼠神经行为学评分,检测脑含水量及脑梗死体积的影响,希望为 ICSI 的临床研究提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 健康 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 0.25~0.30 kg,2.0~2.5 月龄。由上海生旺实验动物养殖有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(沪)2007-0007;使用许可证号:SYXK(沪)(2006-0010),实验前禁食 12 h 但是不禁饮水。

1.2 主要实验仪器及试剂 微量泵注射器(Sigma, 美国),低温灌注箱(北京中杉桥公司),脑温探测仪及探头(Physitemp

公司,美国),激光多普勒(Moor 公司,英国),生物信号采集处理系统(BD 公司,美国)。2,3,5 三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltertrazolium Chloride, TTC)(Sigma 公司,美国),NSE、MMP9 检测试剂盒(博士德生物有限公司,武汉)。

1.3 方 法

1.3.1 模型建立 腹腔注射 10%水合氯醛,取仰卧位。分离颈部重要动脉。保留颈外动脉,剩余给予关闭,颈外动脉近心端丝线活扣备用。剪断颈外动脉远心端,将直径 0.34 mm 的线栓由颈外动脉残端进入,有阻力时停止,记录下时间,栓塞时间为 2 h。采用 Moor Lab 激光多普勒血流仪对模型进行评估,以大鼠造模后皮质脑血流的检测减少至基础血流的 25% 以下认为造模成功。

1.3.2 动物分组 将造模成功的 32 只 SD 大鼠分为 ICSI 组、冰帽组、全身低温组和模型组,各 8 只。温度设置 33℃ 左右,保持 20 min,栓塞 2 h 后利用白炽灯给予迅速复温。冰帽组的大鼠给予自制冰帽降脑温;全身低温组应用冰袋使大鼠肛温降至 33℃;ICSI 组采用微量注射泵从颈内动脉滴注 10~13℃ 的生理盐水,速度 10~25 mL/h。模型组栓塞 2 h 后进行再灌

* 基金项目:广东省深圳市科技计划项目(jcyj20140416122811965)。 作者简介:万勇(1978-),主任医师,硕士,主要从事缺血性脑血管病血管重建,三叉神经痛,面肌痉挛,桥小脑角区占位等方面的研究工作。

注,无其他处理。

1.3.3 脑梗死体积及水肿体积测定^[3] 再灌注 48 h 后处死大鼠,无菌条件下取脑组织,切片 2 mm,用 1% TTC 37 °C 下染色 30 min,4%多聚甲醛固定 12 h。计算 TTC 染色面积。计算方法:(健侧半球体积-患侧未缺血体积)/健侧半球体积×100%。水肿体积的计算公式:[(患侧半球体积/健侧半球体积)-1]×100%。

1.3.4 神经行为学评分^[4] 评分标准:运动实验 3 分,姿势实验 3 分,耳廓反射、角膜反射和惊恐反射、癫痫、肌阵挛或肌张力障碍各 1 分,共 10 分。评分值越高,神经功能受损越严重。

1.3.5 血清学指标 用 ELISA 方法检测 SD 大鼠血清基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)的表达水平,并按照试剂盒说明操作。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 13.00 软件包进行数据处理,计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间采用 *t* 检验,3 组或以上采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各低温方式对脑梗死体积的影响 冰帽组脑梗死体积(34.27%±3.11%)与模型组(49.13%±5.05%)比较,差异有统计学意义($t = 13.04, P < 0.05$),ICSI 组脑梗死体积(25.04%±2.72%)分别与全身低温组(40.37%±4.12%)、冰帽组及模型组比较,差异均有统计学意义($t = 8.37, 5.31, 11.47, P < 0.05$)。见图 1。



图 1 大鼠 TTC 染色(白色为梗死灶)

2.2 各低温方式对脑含水量的影响 全身低温组(82.17%±1.31%)和 ICSI 组(77.04%±1.53%)的含水量低于模型组(83.27%±4.16%),差异有统计学意义($P < 0.05$);冰帽组含水量(81.95%±3.58%)低于模型组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。ICSI 组与冰帽组、全身低温组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 各低温方式对神经行为学的影响 各组间 24 h 神经行为学评分比较,差异有统计学意义($F = 10.36, P < 0.05$)。两组间比较提示,ICSI 组与模型组、冰帽组、全身低温组比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。各组别的 48 h 神经行为学评分比较,差异有统计学意义($F = 9.48, P < 0.05$)。两组间比较提示,ICSI 组与模型组、冰帽组、全身低温组比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。同组内的 *t* 检验结果显示,ICSI 组的 24 h 与 48 h 神经行为学评分差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 24 h 及 48 h 神经行为学评分($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	<i>n</i>	24 h	48 h	差值	<i>t</i>	<i>P</i>
模型组	8	8.21±0.25	7.90±0.63	0.32±0.13	0.68	>0.05
冰帽组	8	7.83±1.34	6.47±1.38	0.45±0.07	1.83	>0.05
全身低温组	8	8.01±0.57	7.62±0.43	0.40±0.11	1.09	>0.05
ICSI 组	8	6.68±0.72	5.48±1.05	1.19±0.32	6.06	<0.05

2.4 各低温方式对血清学指标的影响 血清 MMP-9 的表达在 ICSI 组、模型组、冰帽组和全身低温组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型组相比较,冰帽组和全身低温组中的血清 NSE 差异无统计学意义($P > 0.05$);然而,ICSI 组中的血清 NSE 的表达水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组血清 MMP-9 和 NSE 之间的比较($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	<i>n</i>	NSE	MMP-9
模型组	8	1.7±0.5	73.2±40.6
冰帽组	8	1.4±0.7	86.8±38.5
全身低温组	8	1.6±0.8	66.7±13.1
ICSI 组	8	0.6±0.2	45.4±24.5

3 讨论

“治疗性低温”是人们公认的、有效的保护脑细胞的措施,目前已经广泛用于治疗各种原因引起的缺血缺氧性脑病和头部外伤等,并且取得了一定的成效。低温能够通过抑制脑梗死后发生的缺血级联反应来保护神经。冰帽是目前最简单局部降低脑温度的措施,效果可靠,快捷方便,已广泛使用于各大医疗机构。全身低温是目前临床最常用的低温方式,但其降温效果较差及严重的不良反应如心律失常、感染、凝血功能障碍等使其应用大大的受到限制,削弱了它的脑保护作用。为了寻找一种最佳的脑低温方式,减少全身低温的并发症,近年来人们开始使用选择性脑低温进行治疗^[5]。血管内灌注为目前新颖的低温措施,能最大程度的降低全身低温引起的不良反应。同时其降温速度、疗效更确切。目前大量的临床研究表明,ICSI 可以迅速降低大鼠的脑部温度,保护脑功能的效果显著,临床安全性可以保证^[6-9]。本研究旨在进一步比较 ICSI 与其他低温方式对大鼠脑梗死后细胞的保护作用,希望能为深入研究 ICSI 和选择不同的低温方式提供重要的实验基础。

本研究比较 ICSI、全身低温和冰帽对大鼠脑梗后体积,神经学行为、含水量和血清 MMP-9 和 NSE 表达的影响,共使用了 42 只 SD 大鼠,其中成功造模的有 32 只,10 只由于线栓未能成功入颅或者发生蛛网膜下腔出血等未能入选。本实验发现,冰帽组脑梗死体积与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),ICSI 组脑梗死体积分别与全身低温组、冰帽组及模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。脑含水量的测量是评价缺血后脑组织水肿程度的客观指标之一。本研究结果显示,全身低温组和 ICSI 组的含水量低于模型组($P < 0.05$);冰帽组含水量低于模型组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。ICSI 组与冰帽组、全身低温组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。急性期的神经功能评分结果提示,ICSI 组的 24、48 h 神经行为学评分均明显低于模型组及其他低温组。同时本研

究结果提示,仅 ICSI 组的 48 h 的评分显著低于 24 h 的评分,表明冰帽具有治疗时间窗较广,降温设备需求低的优势,但是存在脑深部降温效果差、降温不均匀和速度不可控的缺陷。与全身低温和冰帽相比较,ICSI 可明显改善神经功能缺损,可能与以下原因有关:(1)ICSI 除了低温效果,还具有对梗死区局部血管的冲洗作用^[10];(2)ICSI 的降温速度较快,而全身低温可能延误治疗的最佳时机。由此可见,脑梗死患者急性病情加重、死亡的重要原因为脑组织水肿的加剧,进而形成颅内压升高继发脑疝形成^[11]。ICSI 可以明显减轻脑细胞的组织水肿,有效改善脑缺血急性期的神经功能,预防神经变性、坏死,从而最大程度提高脑梗死的预后^[12]。

NSE 主要在神经内分泌源细胞和神经元细胞,正常状态下在血清中只有微量,当颅脑组织受到损伤时,神经胶质细胞和神经元细胞出现坏死,则释放出大量 NSE,同时脑缺血后引起的血脑屏障损伤能释放出 MMP-9。有研究表明,血清 NSE 可以反映中枢神经系统的损伤程度,同时也能在某种程度上预示疾病的进展;MMP-9 可以反映血脑屏障的损伤程度。本研究的结果表明,ICSI 组中的 MMP-9 表达水平虽然下降,但是差异无统计学意义($P>0.05$)。而 ICSI 可以明显地降低血清 NSE 的表达,可见 ICSI 对于神经胶质细胞和神经元细胞有保护作用。

综上所述,颈内动脉间断灌注冷生理盐水是一种快速、高效、安全的实施选择性脑部低温方法,可显著减少梗死体积、减轻脑水肿、改善神经功能和血清学指标,并且其效果优于全身低温和冰帽。

参考文献

[1] Kim JH, Lee YW, Park KA, et al. Agmatine attenuates brain edema through reducing the expression of aquaporin-1 after cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(5):943-949.

[2] González-Ibarra FP, Varon J, López-Meza EG. Therapeutic hypothermia: critical review of the molecular mechanisms of action[J]. *Front Neurol*, 2011(2):4.

[3] 赵沃华,吉训明,凌锋,等.大鼠动脉内局部低温脑梗死模型的建立和特点[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2010,

39(1):109-112.

[4] 吴达荣,陈世文,曾志芬,等.亚低温对急性脑梗死大鼠溶栓治疗时间窗的影响[J]. *山东医药*, 2013, 53(41):27-29.

[5] Zhao WH, Ji XM, Ling F, et al. Local mild hypothermia induced by intra-arterial cold saline infusion prolongs the time window of onset of reperfusion injury after transient focal ischemia in rats[J]. *Neurol Res*, 2009, 31(1):43-51.

[6] Choi JH, Marshall RS, Neimark MA, et al. Selective brain cooling with endovascular intracarotid infusion of cold saline: a pilot feasibility study[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2010, 31(5):928-934.

[7] 冀雅彬,吴永明,姬仲,等.不同低温诱导方式对大鼠脑梗死急性期的治疗效果比较[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(1):89-92, 100.

[8] Chen J, Ji X, Ding Y, et al. A novel approach to reduce hemorrhagic transformation after interventional management of acute stroke: catheter-based selective hypothermia[J]. *Med Hypotheses*, 2009, 72(1):62-63.

[9] Schwartz AE, Finck AD, Stone JG, et al. Delayed selective cerebral hypothermia decreases infarct volume after reperfused stroke in baboons [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2011, 23(2):124-130.

[10] Doshi M, Kuwatori Y, Ishii Y, et al. Hypothermia during ischemia protects against neuronal death but not acute brain edema following transient forebrain ischemia in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(12):1957-1961.

[11] Horstmann S, Koziol JA, Martinez-Torres F, et al. Sonographic monitoring of mass effect in stroke patients treated with hypothermia. Correlation with intracranial pressure and matrix metalloproteinase 2 and 9 expression[J]. *J Neurol Sci*, 2009, 276(1/2):75-78.

[12] 万勇,陈东.颈动脉内等体温与冷 0.9%氯化钠注射液灌注在大鼠脑梗死中的比较研究[J]. *山西医药杂志*, 2015, 44(12):1352-1354.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-04-06)

(上接第 3618 页)

released by necrotic human glioblastoma cells stimulates tumor cell growth through the formyl peptide receptor 1 [J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(3):1504-1512.

[14] Babbitt BA, Lee WY, Parkos CA, et al. Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(28):19588-19599.

[15] Cheng TY, Wu MS, Lin JT, et al. Annexin a1 is associated with gastric Cancer survival and promotes gastric

Cancer cell invasiveness through the formyl peptide receptor/extracellular signal-regulated kinase/integrin beta-1-binding protein 1 pathway[J]. *Cancer*, 2012, 118(23):5757-5767.

[16] Cheng TY, Wu MS, Lin JT, et al. Formyl peptide receptor 1 expression is associated with tumor progression and survival in gastric Cancer [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(5):2223-2229.

(收稿日期:2016-02-14 修回日期:2016-04-06)