

·论著·

高压氧治疗实验性新生猪缺氧缺血性脑损伤的研究

薄涛¹, 韩玉昆¹, 舒航²

(1. 中国医科大学第二临床学院儿科, 辽宁 * 沈阳 110003; 2. 黑龙江富锦市中心医院儿科, 黑龙江 * 富锦 156100)

[摘要] 目的 使用新生猪复制新生儿缺氧缺血性脑损伤(HIBD)模型,研究高压氧(HBO)对HIBD的治疗作用,并探讨其机制。方法 30只7d仔猪使用改良Levine法复制HIBD模型后,随机分为HBO组(16只)和对照组(14只)。HBO组采用纯氧加压至170 kPa,每天1次,对照组无任何治疗。分别于缺氧缺血(HI)后1d,7d处死每组各一半的仔猪,观察两组仔猪的死亡率及神经系统症状、右颈总动脉血流量(rVCA)、脑重、脑内亚二倍体细胞的比例。结果 HBO组死亡率及神经症状发生率显著低于对照组($P < 0.01$)。第1次HBO治疗后,HBO组rVCA为(146.8 ± 16.8) ml/min,明显高于对照组(123.9 ± 27.6) ml/min($P < 0.05$)。HI后1d和7d两组脑重量均无显著差异($P > 0.05$)。亚二倍体细胞所占的比例,HI后1d时HBO组两侧海马区及左侧额顶叶皮质均明显低于HIBD组[(13.92 ± 6.04)% vs (21.84 ± 7.58)%,(14.66 ± 6.16)% vs (22.65 ± 6.55)%,(12.16 ± 7.07)% vs (21.65 ± 8.38)%], $P < 0.05$;HI后7d时仅两侧海马区差异有显著性[(14.32 ± 6.46)% vs (25.04 ± 6.37)%,(9.41 ± 6.00)% vs (17.06 ± 7.38)%], $P < 0.05$ 。结论 HBO治疗HIBD具有一定的效果,作为一种HIBD的治疗方法,以早期、短期应用效果为佳。

[关键词] 高压氧;脑缺氧;脑缺血;新生猪

[中图分类号] R-332;R459.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)-04-0352-03

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic ischemic brain damage, HIBD)是围产期新生儿因缺氧导致的脑部病变,主要由宫内窘迫、新生儿窒息缺氧引起,是围产期足月儿脑损伤的最常见原因。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)是在高压环境下吸入高浓度氧治疗疾病的方法,在治疗成人脑血管疾病方面取得了良好的疗效,并通过动物实验取得了较肯定的结果^[1-5]。但在HIBD的治疗上,缺乏确实的实验资料,本文通过对新生猪HIBD模型使用HBO治疗,研究HBO对HIBD的治疗作用,并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

YLC 0.5/I型婴儿高压氧舱(中国船舶工业总公司第701研究所);Toshiba流式细胞仪;16导生理记录仪;RNase(华美生物工程公司),碘化丙啶PI(Sigma公司),蛋白酶K(Merck公司)。

1.2 动物模型的复制

应用改良Levine法^[6]复制HIBD模型。取自中国医科大学第二临床学院实验动物部出生7d的健康仔猪30只,体重(2.5 ± 0.1) kg,腹腔注射10%水合氯醛2 ml/kg麻醉后,常规消毒颈部皮肤,沿颈正中切口,应用动脉夹夹闭右颈总动脉后,置于低氧舱中(O₂:N₂),舱内氧浓度保持在(8.0 ± 0.5)%,舱温控制在(36.5 ± 0.5)°,2h后取出,松开动脉夹。

1.3 动物模型的分组

将HIBD仔猪随机分为对照组(14只)和HBO组(16只)。对照组不予任何治疗,HBO组在脑缺氧缺血(HI)后立即给予HBO治疗,压力为17 kPa,升压及降压各0.5 h,稳压2 h,其间稳压换气2次,每次20 min,高压氧治疗结束后,同时缝合两组仔猪切口。其后,HBO组每日1次高压氧治疗,参数同前。其间通过血气监测动脉血氧。分别于HI后1d,7d处死每组各一半的仔猪,断头取脑。

1.4 标本采集及观察指标

(1)仔猪的死亡率及神经系统症状;(2)右颈总动脉血流量(velocity of right carotid artery, VCA):比较HI前、结束后即刻及3h两组VCA;(3)两组

[收稿日期] 2001-02-20; [修回日期] 2001-06-04
[作者简介] 薄涛(1972-),男,博士,主治医师。

脑重量的比较;(4)脑内亚二倍细胞的定量检测:分别取两组脑双侧额顶叶皮层及海马区标本,经蛋白酶 K 消化成单细胞悬液,70%乙醇固定,RNase A 消化,PI 染色,通过流式细胞技术,应用 Cellquest 软件,计算亚二倍体细胞所占百分比。

1.5 统计学处理

计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间比较应用 *t* 检验,率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 仔猪死亡率及神经系统症状

对照组死亡率(4/14)明显高于 HBO 组(0/16) ($P < 0.01$),仔猪的死亡均发生在模型复制后 24 h 内。神经系统损伤症状表现为早期四肢抽动、3~4 d 出现右眼不睁、舌右偏、左后肢硬瘫,对照组发生率明显高于 HBO 组 ($P < 0.01$ 或 0.05)。见表 1。第 1 次治疗后,HBO 组的 PaO₂ 为(90.89 ±17.87) mmHg,明显高于对照组(77.17 ±15.60) mmHg,但未超过 100 mmHg。

2.2 仔猪脑重量比较

于 1 d,7 d 处死的仔猪两侧脑重量比较差异无显著性 ($P > 0.05$),两组仔猪同侧脑组织比较差异亦无显著性 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 HBO 组与对照组神经系统症状及脑重量比较

	肢体抽动	左后肢瘫	右眼不睁	脑重量		
				右(g)	左(g)	(右-左)/右(%)
第 1 天						
对照组	8/10	- - - -	- - - -	19.20 ±1.92	18.40 ±1.52	4.21 ±2.36
HBO 组	5/16 ^a	- - - -	- - - -	18.88 ±1.13	17.75 ±1.04	6.38 ±3.15 ^a
第 7 天						
对照组	- -	3/5	4/5	17.00 ±3.56	18.00 ±2.58	7.57 ±16.00
HBO 组	- -	1/8 ^b	1/8 ^b	18.00 ±0.93	17.25 ±1.17	4.52 ±4.36 ^a

注: a * "与对照组比较 $P < 0.01$; b * "与对照组比较 $P < 0.05$

2.3 rVCA 比较

rVCA 在模型复制结束时,两组之间差异无显著 ($P > 0.05$),在 3 h 后即 HBO 组结束高压氧治疗后,其 VCA 明显高于 HIBD 组 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.4 亚二倍体细胞

HI 后 1 d,7 d,两组额顶叶皮质及海马区细胞行流式细胞技术检查,均显示存在两群细胞,即亚二倍体细胞群和二倍体细胞群。亚二倍体细胞所占的比例,HI 后 1 d 时,HBO 组两侧海马区及左侧额顶

叶皮质均明显低于 HIBD 组 ($P < 0.05$),两组右额顶叶皮质区差异无显著性 ($P > 0.05$)。HI 后 7 d,仅两侧海马区差异有显著性 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 HBO 组与对照组 VCA 比较 (ml/min)

	例数	HI 前	0 h	3 h
对照组	14	138.6 ±2.7	137.9 ±15.8	123.9 ±27.6
HBO 组	16	140.6 ±11.0	135.6 ±14.9	146.8 ±16.8 ^a

注: a * "与对照组比较 $P < 0.01$

表 3 HBO 组与对照组额顶叶皮质和海马区亚二倍体细胞比较 (%)

	例数	右额顶叶	右海马	左额顶叶	左海马
第 1 天					
对照组	5	20.79 ±6.86	21.84 ±7.58	22.65 ±6.55	21.65 ±8.38
HBO 组	8	13.97 ±8.11	13.92 ±6.04 ^a	14.66 ±6.16 ^a	12.16 ±7.07 ^a
第 7 天					
对照组	5	16.95 ±3.87	25.04 ±6.37	20.28 ±6.72	17.06 ±7.38
HBO 组	8	11.32 ±8.26	14.32 ±6.46 ^a	16.68 ±11.81	9.41 ±6.00 ^a

注: a * "与对照组比较 $P < 0.05$

3 讨论

HBO 治疗 HIBD 从临床上观察,不仅可促进神经症状恢复,缩短病程,并且在有效减少神经系统后遗症、改善预后方面,已有相应报道^[6]。但是由于在人类治疗 HIBD 不能设立空白对照组,必然混杂有其它疗法作用,而且在选择治疗对象方面,轻重程度不尽相同,故 HBO 疗法在治疗 HIBD 尚未得到广泛的认可。本实验中,通过建立 HIBD 动物模型,规范了 HI 损伤程度,设立了治疗的空白对照组,治疗组也仅仅应用 HIBD 动物模型,规范了 HI 损伤程度,设立了治疗的空白对照组,治疗组也仅仅应用 HBO 治疗,该组仔猪的死亡率及神经系统症状发生率明显低于对照组,提示 HBO 在治疗 HIBD 方面有一定的临床疗效。

Mink 等发现 HBO 能降低脑皮质血管通透性,维持血脑屏障的完整性,并可以通过改善脑细胞的能量代谢,维持细胞膜的离子泵功能,减轻脑水肿^[7]。本实验中,HI 后 1 d 每组两侧脑重均无显著性差异,而且组间也未见差异,未显示出 HBO 能明显减轻脑水肿,但由于本实验所设定的时间点偏少,HBO 发挥脱水作用可能在 1 d 之后,也可能 HBO 并非主要通过减轻脑水肿起到治疗作用。在第 7 天时,虽然脑重量仍无差异,但 HIBD 组已显示减轻趋势,可能由于本实验所使用的例数偏少未发现 HBO 防止脑重量的减轻。

在 HIBD 时,脑血管的自动调节功能降低,当脑血流灌注量受周身血压下降而减少,血管周围的星形胶质细胞和血管内皮细胞肿胀,使管腔变窄甚至闭塞,脑血流恢复后,血液仍不能流至这些缺血区,造成脑实质不可逆转损害。本研究显示再灌注 3 h 后,HBO 组 VCA 较 HI 前无显著差异,对照组则明显下降,间接提示 HBO 可以减轻脑血管床的阻力,能维持 HI 损伤后的正常血流灌注,保证脑组织的供血供氧,从而迅速改善能量代谢,保护脑细胞。与 Neubauer 等应用 SPECT 技术发现 HBO 可以改善成人脑缺血性损伤后脑血流和细胞代谢的结果相一致^[6]。

神经细胞的死亡现在认为存在凋亡和坏死两种形式,因为两者均发生染色体的断裂,通过测定亚二倍体所占的比率即可了解脑细胞损伤的情况。本实验应用流式细胞技术清楚反映 HIBD 时,脑内存在两群细胞,即二倍体细胞群和亚二倍体细胞群。在 HBO 治疗后,能显著减少亚二倍体细胞的比例,这反映 HBO 能降低 HI 对脑细胞的损伤。但是,HBO 有保护作用具有时效性和区域选择性,HBO 对于海马区的保护作用优于额叶皮质区,短期疗效佳。Konda 等通过形态学研究也发现 HBO 能够抑制 HI 所诱导的海马 CA1 区细胞凋亡发生,而且在缺血发生 6 h 内应用 HBO 明显优于 24 h 后开始治疗^[8]。从而提示 HBO 应早期应用,应用时间在 1 周内为宜,应结合其它疗法,作为综合疗法中的一部分。

[参 考 文 献]

- [1] Veltkamp R, Warner DS, Domoki F, et al. Hyperbaric oxygen decrease infarct size and behavioral deficit after transient foetal ischemia in rat [J]. *Brain Res*, 2000, 853(1): 68 - 73.
- [2] Vila JF, Balcarce PE, Abiusi GR, et al. Hyperbaric oxygenation in subeortical frontal syndrome due to small artery disorders with leukoaraiosis [J]. *Rev Neurol*, 1999, 28(7): 655 - 660.
- [3] Nighoghossian N, Trouillas P, Adeleine P, et al. Hyperbaric oxygen in the treatment of acute ischemic stroke. A double-blind pilot study [J]. *Stroke*, 1995, 26(8): 1369 - 1372.
- [4] Krakovsdy M, Rogatsky G, Zarchin N, et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on survival after global cerebral ischemia in rat [J]. *Sung Neurol*, 1998, 49(4): 412 - 416.
- [5] Nighoghossian N, Trouillas P. Hyperbaric oxygen in the treatment of acute ischemic stroke: an unsettled issue [J]. *Neurol Sci*, 1997, 150(1): 27 - 31.
- [6] Neubauer RA, James P. Cerebral oxygenation and the recoverable brain [J]. *Neurol Res*, 1998, 20(Suppl 1): s33 - 36.
- [7] Mink R, Dutka A. Hypobaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits reduces brain vascular permeability and blood flow [J]. *Stroke*, 1995, 26(12): 2357 - 2362.
- [8] Konda A, Baba S, Iwaki T, et al. Hyperbaric oxygenation prevents delayed neuronal death following transient ischemia in the gerbil hippocampus [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1996, 22(4): 350 - 360.

(本文编辑:曹励之 英文译文见本期 446 页)