

·论著·

# 高压氧治疗新生大鼠缺氧缺血性脑损伤量效及时效关系

刘丽旭,杨于嘉

(中南大学湘雅医院儿科,湖南·长沙 410008)

**[摘要]** 目的 探讨不同压力和不同稳压时间下高压氧(HBO)对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)模型的治疗疗效,旨在找出 HBO 治疗的最佳剂量(压力)与时间,为临床上 HBO 在新生儿缺氧缺血性脑病中的应用提供实验依据。方法 新生 7 d 龄 SD 大鼠随机分为空白对照组、HIBD 模型组及 HBO 治疗组, HBO 组又根据治疗压力的不同分为 7 组:1 ATA, 1.25 ATA, 1.5 ATA, 1.75 ATA, 2 ATA, 2.25 ATA 及 2.5 ATA, 再选取最佳治疗压力, 根据治疗时间不同分为 2 组:稳压 30 min 组和 60 min 组, 均于 HBO 治疗 7 d 后(14 d 龄)处死, 观察大鼠体重增长情况、左/右脑重比、脑病变率以及脑组织匀浆超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量。结果 HIBD 组体重增长率 $[72.91 \pm 21.27\%]$ 降低,左、右脑重比值 $(0.64 \pm 0.16)$ 下降,脑组织匀浆 SOD 含量 $[(203.32 \pm 57.18) \text{ NU/ml}]$ 降低而 MDA 含量 $[(4.20 \pm 0.68) \text{ nmol/ml}]$ 升高,与对照组比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ ); HBO 治疗后随着 HBO 治疗压力的增高,体重增长率及左/右脑重比值逐渐上升,脑病变率下降,脑组织匀浆 SOD 含量增加,MDA 含量逐渐下降,在 2.0 ATA 组[体重增长率 $(84.14 \pm 18.35)\%$ ,左右脑重比值 $(0.85 \pm 0.15)$ ,SOD 含量 $[(259.20 \pm 45.22) \text{ NU/ml}]$ ,MDA 含量 $[(34.62 \pm 0.50) \text{ nmol/ml}]$ ]疗效达到最佳,与 HIBD 组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。HBO 60 min 组体重增长率、左/右脑重比值、脑病变率及脑组织匀浆 SOD 含量均较 HBO 30 min 组有所上升,但两组比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 2.0 ATA 压力下、稳压时间为 30 ~ 60 min 的 HBO 治疗新生大鼠 HIBD 时效最佳;适当的 HBO 治疗使 HIBD 大鼠脑组织匀浆中原本降低的 SOD 含量升高,同时使原本增高的 MDA 水平下降。

**[关键词]** 缺氧缺血性脑损伤;高压氧;治疗;新生大鼠

**[中图分类号]** R-332;R459.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)04-0355-04

新生儿缺氧缺血性脑病(Hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿期脑损伤中常见疾病,病死率与致残率高,其发病机制目前还不十分清楚,治疗较为棘手。高压氧(hyperbaric oxygenation, HBO)是指机体在处于高于 1 个大气压环境中呼吸的与环境等压的纯氧<sup>[1]</sup>,它能明显改善机体对氧的摄取和利用方式,使血氧含量增多,血氧分压增高,血氧弥散能力增强。研究表明:1 ATA 下吸入空气,氧在脑组织中的有效弥散半径为 30  $\mu\text{m}$ , 2 ATA 和 3 ATA 纯氧吸入时则可使氧在组织中弥散半径分别达到 60 ~ 70  $\mu\text{m}$  和 100  $\mu\text{m}$ ,从而起到改善组织供氧的弥散作用,恢复缺氧缺血脑细胞的正常能量代谢,挽救濒死的细胞,因而可用于 HIE 的治疗。

由于新生儿有其特有的组织结构和生理特点,目前对新生儿 HIE 使用 HBO 的利弊仍存在较大争议,有关动物实验结果也有矛盾,且至今为止尚无高压氧作用于新生动物量效与时效关系的系统分析研究,使 HBO 在新生儿的应用受到了一定的限制。本实验研究了不同压力和不同稳压时间下 HBO 对新生大鼠缺血缺氧性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)模型的治疗疗效,同时测定脑组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量,旨在探讨 HBO 治疗的最佳压力和时间,及观察 HBO 对机体脂质过氧化的影响,以期在 HIE 中的临床应用提供实验依据。

[收稿日期] 2001-03-14; [修回日期] 2001-07-15  
[作者简介] 刘丽旭(1972-),女,博士,主治医师。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

高压氧舱: YLC 0.5/1 A 型婴儿高压氧舱, 由中国船舶工业总公司第 701 研究所研制; SOD 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; MDA 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

### 1.2 动物分组

健康 Sprague-Dawley (SD) 新生 7 d 龄大鼠共 137 只, 雌雄不限, 体重 12 g 以上, 分两阶段进行: HBO 治疗量效关系观察: 根据治疗压力的不同将实验动物随机分为 7 组: 压力分别为 1 ATA (H 1.0), 1.25 ATA (H 1.25), 1.5 ATA (H 1.5), 1.75 ATA (H 1.75), 2 ATA (H 2.0), 2.25 ATA (H 2.25) 及 2.5 ATA (H 2.5), 同时设空白对照组 (control, CON) 及 HIBD 组, 于 HBO 治疗 7 d 后 (14 d 龄) 处死。每组 8~19 只, 共 121 只。根据上述实验结果, 选取最佳 HBO 治疗压力, 根据治疗时间不同分为 2 组, 稳压 30 min 组 (H 30 min) 和 60 min (H 60 min), 于 HBO 治疗 7 d 后 (14 d 龄) 处死, 每组 8 只, 共 16 只。

### 1.3 HIBD 模型制作方法

采用经典 Rice 模型<sup>[2]</sup>。7 d 龄 SD 新生鼠, 乙醚吸入麻醉, 行颈部正中切口, 分离左颈总动脉后双线结扎, 缝合伤口, 休息 30 min~2 h 后, 将大鼠置于有机玻璃低氧舱内, 按一定比例输入氧气和氮气, 测氧仪监测氧浓度在 8% (7%~9%), 缺氧时间持续 2 h。

### 1.4 高压氧治疗方法

HBO 组制成 HIBD 模型后 15~30 min 内进舱, 纯氧洗舱 15 min, 流量为 10 L/min; 加压时间为 15~20 min, 流量 5~8 L/min; 稳压分两个阶段: 首先固定稳压时间为 30 min, 分别给予 1 ATA, 1.25 ATA, 1.5 ATA, 1.75 ATA, 2 ATA, 2.25 ATA 及 2.5 ATA 的压力治疗, 选出最佳压力后固定压力, 分别给予 30 min 或 60 min 稳压时间, 进行观察, 稳压期间氧流量为 3~5 L/min, 平均氧浓度保持在 85%~90% 或以上; 最后匀速减压 20~30 min。治疗均为每天 1 次, 连续 7 d, 于 HBO 治疗结束后 (14 d 龄) 处死。

### 1.5 统计学处理

数据使用 Excel 5.0 软件及 SPSS 10.0 软件包处理, 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两样本均数比较用  $t$  检验, 多样本均数比较用方差分析, 总体率 (构成比) 的比较用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

### 2.1 不同压力下 HBO 治疗的作用

#### 2.1.1 各组大鼠体重增长率及左、右脑重比值情况

HIBD 组体重增长率较空白对照组明显下降 [(72.91 ± 21.27)% vs (104.97 ± 17.34)%], 差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ ); 随着 HBO 治疗压力的增高, 体重增长率有上升趋势, 在 2.0 ATA, 2.25 ATA 和 2.5 ATA 时最高 [(84.14 ± 18.35)%, (87.31 ± 19.64)%, (85.02 ± 10.96)%], 但与 HIBD 组比较及各组间比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 1。HIBD 组左/右脑重比值与对照组比较明显下降 [(0.64 ± 0.16) vs (0.99 ± 0.04)], 差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。当给予不同压力 HBO 治疗后, 随着压力的增高, 左/右脑重比值逐渐上升, 至 1.5 ATA, 1.75 ATA 和 2.0 ATA 左/右脑重比值 (0.78 ± 0.15, 0.82 ± 0.14, 0.86 ± 0.15) 与 HIBD 组比较差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ ), 以 2.0 ATA 组左、右脑重比值最高, 当压力进一步加大时, 左/右脑重比值反而下降, 甚至低于 HIBD 水平, 提示压力过高可使左脑损伤加重。见图 2。以上结果显示 2.0 ATA 压力下的 HBO 治疗可使体重增长率提高, 左、右脑重比值达到最大。

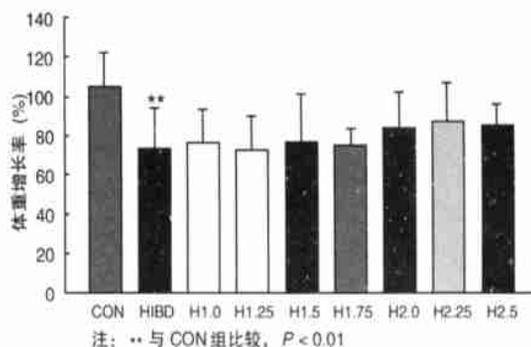


图1 各组大鼠体重增长率比较

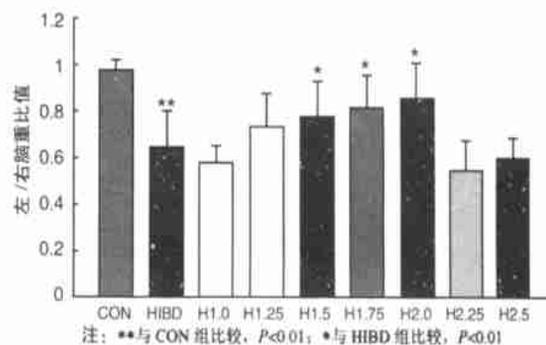


图2 各组大鼠左、右脑重比值比较

2.1.2 各组大鼠脑组织形态学改变 肉眼观察将脑病变情况分为正常、轻度及重度改变。正常指肉眼未见明显异常,轻度指左脑萎缩、软化或液化等病变范围 < 1/2,重度则是指左脑病变范围 > 1/2。HIBD 组脑病变率最高;HBO 治疗后脑病变率有所下降,以 HBO 2.0 组最低,但当压力升至 2.25 ATA 和 2.5 ATA 时,脑病变率复又明显上升,HBO 2.5 组达到 100%,提示过高压力的 HBO 反而加重脑病变程度。但 HIBD 组及各 HBO 治疗组经 <sup>2</sup> 检验,差异无显著性意义(  $P > 0.05$  )。见表 1。

表 1 各组脑组织病变情况比较

组别	例数	脑病变			脑病变率(%)
		正常	轻度	重度	
HIBD	19	3	3	13	84.21
HBO 1.0	16	4	5	7	75.00
HBO 1.25	12	4	3	5	66.67
HBO 1.5	18	5	5	8	72.22
HBO 1.75	9	3	4	2	66.67
HBO 2.0	13	6	4	3	53.85
HBO 2.25	8	1	1	6	87.5
HBO 2.5	8	0	0	8	100.0

注: 各组经 <sup>2</sup> 检验,差异无统计学意义

2.1.3 脑组织匀浆 MDA,SOD 含量变化 HIBD 组 SOD 含量较正常对照组明显下降 [(203.32 ± 57.18) NU/ml vs (261.53 ± 41.38 NU/ml)],差异有显著性意义(  $P < 0.01$  ),提示 HIBD 后 SOD 含量下降,对氧自由基的清除作用减弱。HBO 治疗组随着压力的提高,SOD 含量逐渐上升,2.0 ATA 组为 (259.20 ± 45.22) NU/ml 达最高,与 HIBD 组比较,差异有显著性意义(  $P < 0.05$  ),提示 2.0 ATA 压力下可促使 SOD 产生增多,从而起到清除氧自由基的目的;而 2.25 ATA 及 2.5 ATA 压力下 SOD 含量则复又下降。脑组织匀浆 MDA 含量改变与前者相反,HIBD 组 MDA 含量与正常对照组比较明显升高 [(4.20 ± 0.68) NU/ml vs (3.39 ± 0.57) NU/ml],差异有显著性意义(  $P < 0.01$  ),说明 HIBD 后氧自由基产生增多;HBO 治疗组随着压力的提高,MDA 水平有下降趋势,至 2.0 ATA 时 MDA 含量 [(3.46 ± 0.50) NU/ml]降至最低,与 HIBD 组比较,差异有显著性意义(  $P < 0.05$  );此后在 2.25 ATA 及 2.5 ATA 压力下 MDA 水平复又上升。以上结果显示,在 2.0 ATA 压力下进行 HBO 治疗时,脑组织匀浆 MDA 水平最低,而 SOD 含量最高。

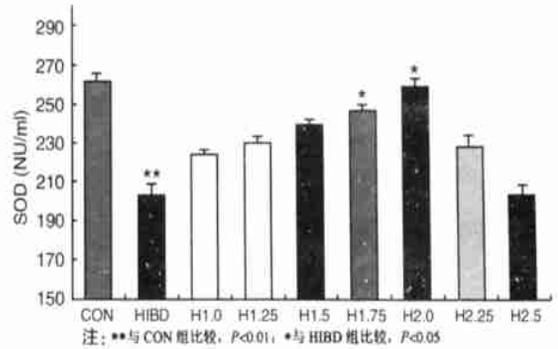


图 3 不同 HBO 治疗压力下脑组织匀浆 SOD 含量改变

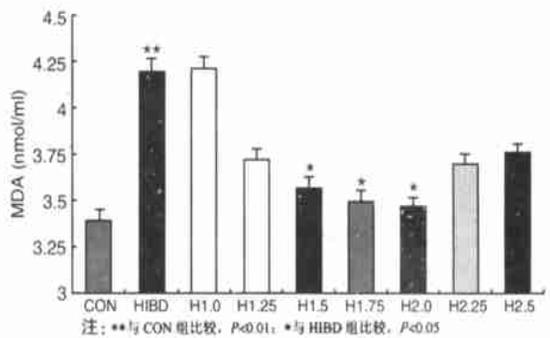


图 4 不同 HBO 治疗压力下脑组织匀浆 MDA 含量改变

## 2.2 不同稳压时间的 HBO 治疗疗效

根据以上结果,选取最佳 HBO 治疗压力 2.0 ATA,固定此压力不变,将稳压时间改为 60 min,观察 HBO 30 min 组和 HBO 60 min 组各指标的变化情况。

2.2.1 不同稳压时间体重增长率、左/右脑重比值及脑病变率比较 HBO 60 min 组体重增长率及左/右脑重比值分别为 (96.75 ± 18.71)%, 0.88 ± 0.13, 均较 HBO 30 min 组 [(84.14 ± 18.35)%, 0.86 ± 0.15]有所上升,但并无统计学意义(  $P > 0.05$  )。两组脑病变范围比较显示,HBO 30 min 组脑病变率为 53.85%,其中轻度 30.77% (4/13)、重度 23.08% (3/13);HBO 60 min 组脑病变率为 62.5%,其中轻度 50.0%,重度则降至 12.5%,由于例数较少,两组经 <sup>2</sup> 检验,差异无统计学意义(  $P > 0.05$  )。

2.2.2 不同稳压时间组脑组织匀浆 SOD 及 MDA 含量改变 HBO 30 min 组脑组织匀浆 SOD 及 MDA 含量分别为 (259.20 ± 45.22) NU/ml, (3.46 ± 0.50) nmol/ml; HBO 60 min 组则分别升至 (296.11 ± 53.49) NU/ml, (3.51 ± 0.45) nmol/ml,提示稳压时间延长至 60 min 时脂质过氧化反应可

能有所增加,同时 SOD 水平亦升高,但两组比较并无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

从本实验结果综合分析发现,随着 HBO 治疗压力的增高,其疗效渐提高,在 2.0 ATA 压力时疗效最佳,此时左/右脑重比值最高,脑病变率最低,提示病变侧脑损伤程度减轻;同时脑组织匀浆 SOD 含量最高而 MDA 含量最低,说明了在此压力下可使 HIBD 所致的增高的脂质过氧化反应明显受抑,同时使机体抗氧化酶系统激活,SOD 产生增多,以加快清除体内的氧自由基。传统观点认为高压氧可导致脂质过氧化系统(LPO)被激活,氧自由基增多<sup>[3]</sup>,目前越来越多的研究表明,HBO 并非都激活脂质过氧化反应,治疗剂量的 HBO 可使原本升高的 LPO 降低,而 SOD 则增高或无变化<sup>[4~6]</sup>。本实验结果与之相符,并发现 2.0 ATA 的 HBO 治疗可提高机体的抗氧化能力,减轻脑损伤,从而对脑组织产生保护作用。总之,2.0 ATA 压力下,稳压时间为 30~60 min 的 HBO 治疗可使 HIBD 大鼠体重增长率和左、右脑重比值明显升高,同时脑组织匀浆中 SOD 含量升高,MDA 含量降低,从而明显减轻了 HIBD 所致的脑损伤,提示 HBO 治疗新生大鼠 HIBD 疗效显著,为临床上 HBO 用于新生儿 HIE 的治疗提供了重要的实验依据。

随着压力的进一步升高,2.25 ATA 和 2.5 ATA 的 HBO 治疗反而使左、右脑重比值下降,脑病变率增加,脑组织匀浆 SOD 含量下降而 MDA 复又上升,提示过高压力的 HBO 不仅不能起到治疗脑损伤的目的,反而加重了脑损伤。SOD 的降低可能与过高压力下 SOD 活性受抑制或消耗过多,以及脂质过氧化物 MDA 含量升高有关。

HBO 治疗可使 HIBD 大鼠体重随着压力的增高而增长,体重增长率提高,过高压力时(2.25 ATA 和 2.5 ATA)左、右脑重比值下降,但体重增长并未停止,提示 HBO 可促进 HIBD 大鼠的体格生长,这可能是因为压力愈高,肌肉骨骼等组织供氧愈充足,细胞生长愈快,此时虽然脑组织病损加重,但整个机体的重量是增加的,因而出现了体重增长率提高。以上现象提示我们机体各组织器官对 HBO 的耐受性不同,过高的 HBO 压力可加重脑组织损伤,对其他组织如肌肉骨骼等则不一定如此,有待于进一步的深入研究。

对同一压力下不同稳压时间的 HBO 治疗研究

表明,60 min 组较 30 min 组的体重增长率和左/右脑重比更高,脑组织匀浆 SOD 水平更高,提示 60 min 组的 HBO 治疗对新生大鼠 HIBD 的保护作用可能较 30 min 组更强,但统计学上并无差异,这可能与样本量不足有关。

HBO 治疗时应注意婴儿高压氧舱的纯氧洗舱方法。洗舱时舱门留一缝隙,宽约 0.5~1 mm,使舱内压力保持在 1 ATA,舱门不能打开过大,否则洗舱后可能达不到所需的氧浓度。加压后舱内氧分压若低于 1 ATA 则不能起到 HBO 治疗作用。舱内氧分压( $PO_2$ )的计算公式为  $PO_2 = P \times P_0$ , $P$  表示舱内实际压力, $P_0$  表示舱内氧浓度。本实验洗舱时间为 15 min,注量为 10 L/min,洗舱后舱内氧浓度可达 70%,继续加压至规定压力时舱内氧浓度可达到 80%或以上,稳压期间氧浓度可继续增高,其舱内平均氧浓度为 85%~90%左右。根据此计算公式计算,本实验所采用的 HBO 各治疗压力除 1 ATA(常压)外均能使舱内氧分压超过 1 ATA,因而可以真正发挥 HBO 的作用。

总之,上述实验结果表明,HBO 治疗新生大鼠 HIBD 模型时存在一个“度”,须适“量”适“时”,方能起到治疗作用。若不足不能起到治疗作用,过量则反而加重脑损伤。本研究通过对 HBO 治疗的量效和时效分析发现,选择 2.0 ATA 压力、稳压时间为 30~60 min 的 HBO 治疗疗效最佳。

### [参 考 文 献]

- [1] 李温仁,倪国坛. 高压氧医学 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1998, 3.
- [2] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB, et al. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131 - 141.
- [3] Barkova EN, Gudim VI, Varnitsyna VV, et al. The spatial-temporal organization of erythropoiesis in exposure of the body to hyperbaric oxygenation [J]. Patol Fiziol Eksp Ter, 1991, 3: 40 - 42.
- [4] Kudhodkar BJ, Wilson J, Lacko A, et al. Hyperbaric oxygen reduces the progression and accelerates the regression of atherosclerosis in rabbits [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(6): 1637 - 1643.
- [5] 刘郁,王燕. 急性一氧化碳中毒大鼠脑 MDA 和 SOD 的变化及高压氧影响 [J]. 急诊医学,1999, 8(4): 227 - 220.
- [6] Mink RB, Dutka AJ. Hyperbaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits does not promote brain lipid peroxidation [J]. Critical Care Med, 1995, 23(8): 1398 - 1404.

(本文编辑:俞燕 英文译文见本期 450 页)