

## 不同浓度高渗盐水对大鼠急性局灶性脑缺血再灌注损伤的保护

李经辉<sup>1)</sup>, 刘艺<sup>1)</sup>, 白鹏<sup>1)</sup>, 陈静<sup>2)</sup>, 孙涛<sup>1)</sup>, 余化霖<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学第一附属医院微创神经外科, 云南昆明 650032; 2) 昆明医科大学, 云南昆明 650031)

**[摘要]** 探讨4种不同浓度高渗盐水对脑缺血再灌注的保护效果并进行比较分析, 为探索最佳高渗盐水浓度治疗脑缺血再灌注损伤提供实验依据. **方法** 采用线栓法制备急性局灶性脑缺血再灌注模型, 分别在缺血前10 min和再灌注12 h静脉给予0.9% NaCl 4 mL/kg (A组), 7.5% NaCl 4 mL/kg (B组)、10% NaCl 4 mL/kg (C组); 23.5% NaCl 4 mL/kg (D组), 每只大鼠于分别于术毕麻醉苏醒后2 h, 再灌注6 h、24 h进行神经行为功能评分, 并应用TTC染色法、干湿重法、常规HE染色法观察每组大鼠脑梗死体积、脑组织含水量及梗塞区中性粒细胞浸润数目. **结果** 神经行为功能评分和脑梗塞体积的测定各组间无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 脑组织含水量D组要少于其余组 ( $P < 0.05$ ), 脑区中性粒细胞浸润情况各组无显著差异 ( $P > 0.05$ ). **结论** 23.5% NaCl脱水作用要强于其余3种浓度NaCl. 对缺血再灌注脑组织梗死体积、梗死区炎性反应及大鼠神经行为功能评分, 4种浓度NaCl之间无显著差异.

**[关键词]** 高渗盐水; 脑水肿; 脑缺血; 线栓法

**[中图分类号]** R362 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 07 - 0054 - 05

## The Comparative Research on Brain Protection of Different Concentrations of Hypertonic Saline on Acute Focal Cerebral Ischemia-reperfusion Injury

LI Jing - hui<sup>1)</sup>, LIU Yi<sup>1)</sup>, BAI Peng<sup>1)</sup>, CHEN Jing<sup>2)</sup>, SUN Tao<sup>1)</sup>, YU Hua - lin<sup>1)</sup>

(1) Dept. of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 2) Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the protective effect of four different concentrations of hypertonic saline on cerebral ischemia and reperfusion and done a comparative analysis to explore the optimal concentration of hypertonic saline and provide experimental evidence for the treatment of cerebral Ischemia-reperfusion injury. **Methods** Thread embolism was performed to made the acute focal cerebral ischemia and reperfusion model, at 10 minutes before ischemia and 12 hours after reperfusion, intravenous 0.9% NaCl 4 mL/kg (A group), 7.5% NaCl 4 mL/kg (B group), 10% NaCl 4 mL/kg (C group); 23.5% NaCl 4 mL/kg (D group), all rats were graded scores of neurobehavioral function at 2 hours after surgery anesthesia, 6 hours and 24 hours after reperfusion. Then the infarct size was measured after stained by TTC; the water content of both hemispheres was calculated; the number of neutrophil at a continuous five fields was counted by HE staining. **Results** The neurobehavioral scores and infarct volume had no significant difference between groups ( $P > 0.05$ ). D group's brain water content was less than the other group ( $P < 0.05$ ), the infiltration of neutrophils at infraction was also no significant difference between groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** The dehydration of 23.5% NaCl is better than the other three concentrations NaCl.

**[基金项目]** 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (09Y0163)

**[作者简介]** 李经辉 (1978~), 男, 云南昆明市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事神经外科临床工作.

**[通讯作者]** 余化霖. E-mail: km\_ljh@126.com

There is no significant difference in the infarct volume of Ischemia-reperfusion brain, infarct inflammation and the score of neurobehavioral function among the four concentrations of NaCl.

[Key words] Hypertonic saline; Cerebral edema; Cerebral ischemia; Suture method

脑缺血再灌注损伤是脑血管病、脑肿瘤切除术以及颅脑外伤, 失血性休克等疾病共同经历的一个复杂的病理生理过程, 近年来, 高渗盐水的抗炎效应逐渐为人们所认识, 大量应用于感染和休克等危重病治疗, 取得了明显的成效, 其具有降低颅内压、改善脑灌注等作用, 而且副作用较少, 有着十分重要的使用价值, 但其中对于应用何种最佳浓度、给药方式及给药剂量等均在探索研究当中, 尚无定论<sup>[1]</sup>. 本研究探讨不同浓度高渗盐水对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护效果, 为探索最佳高渗盐水浓度治疗脑缺血再灌注损伤提供实验依据, 充分发挥高渗盐水在神经科应用的潜在价值.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器、试剂及其他材料

电热恒温干燥箱、AE200 精密电子天平等实验仪器、数码照相机、计算机图像分析系统、极波牌渔线、快干型防霉硅酮密封胶、氯化三苯基四氮唑 (TTC)、多聚甲醛.

### 1.2 实验动物及分组

成年雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 250 ~ 280 g, 由昆明医科大学动物研究中心提供, 随机分成 4 组, 0.9% NaCl (A 组)、7.5% NaCl (B 组)、10% NaCl (C 组)、23.5% NaCl (D 组), 每组 15 只.

### 1.3 线栓的制备

将直径 0.26 mm 和 0.23 mm 两种规格的渔线剪成 5 cm 长的线段, 游标卡尺事先固定在 0.30 mm 并在卡口周围涂上密封胶, 再将剪好的渔线一端置入卡口利用周围的密封胶涂覆约 2 mm 长, 同时慢慢塑成直径 0.3 mm 均匀梭形状线栓头, 在距离其 1 cm、2 cm 处做标记, 风干固定后消毒并浸于肝素钠溶液中备用.

### 1.4 动物模型的建立

参照 Longa 等<sup>[2]</sup>和胡建鹏等<sup>[3,4]</sup>报道的方法, 采用经右侧颈总动脉穿刺法制备大鼠右侧大脑中动脉阻塞再灌注模型, 从而形成局灶性脑缺血的相关症状. 术后单笼饲养, 待麻醉醒后 2 h 进行第 1 次神经功能评分. 评分后拔出线栓进行再经鼠尾静脉注药灌注.

### 1.5 神经行为功能评分

每组大鼠分别于术毕麻醉苏醒后 2 h, 再灌注 6 h、24 h 进行神经行为功能评分. 评分参照 Bederson 等<sup>[5]</sup>、Zea longa 等<sup>[6]</sup>的 5 级 4 分评分方法并改进.

### 1.6 TTC 染色及脑梗塞体积的测定

每组随机选 10 只大鼠行 TTC 染色, 固定后用数码相机照相, 经电脑图像分析量化脑梗死绝对体积占对侧大脑半球体积的百分比, 即相对脑梗死体积, 具体参照罗勇的方法<sup>[7]</sup>计算梗死灶体积和整脑体积:  $V = \Sigma (S1+S2) \cdot d/2$  公式中 V 为总体积; S1、S2 分别表示切片头侧、尾侧面积; d 为切片厚度. 计算梗死灶体积占整脑体积的百分比, 用梗死率 (infarction ratio) 表示梗死灶的大小, 将所得值用于统计学处理.

### 1.7 脑组织含水量的测定

TTC 染色前, 将取出的鼠脑置于培养皿中, 滤纸吸干表面水分, 电子天平精确量湿重并记录. 染色后将脑组织烘干 (105℃, 24 h), 经反复称量直至恒重后记录作为组织干重, 按干湿重法<sup>[8]</sup>算出脑组织含水量. 参考文献方法: 脑组织含水量计算公式:

$$\text{脑组织含水量 (\%)} = \frac{\text{脑湿重} - \text{脑干重}}{\text{脑湿重}} \times 100\%$$

### 1.8 病理学光镜下观察大鼠脑区中心粒细胞浸润情况

每组随机抽 5 只大鼠于再灌注 24 h 结束后经生理盐水及 40 g/L 多聚甲醛液灌流固定后开颅取脑, 采用视交叉前缘作 2 mm 厚冠状切片, 常规制片, 苏木精-伊红染色并进行组织病理学观察. 在梗塞区以 1 个高倍视野为 1 个单位面积, 连续计数 5 个视野内中性粒细胞浸润的数目, 取其平均值.

### 1.9 统计学处理

收集整理实验组数据, 应用 SPSS 统计分析软件包进行处理; 各组均数以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 非正态分布的用中位数表示. 两组间差异用独立样本 t 检验或方差分析, 组内比较用变异系数.  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

整个制模过程按照剔除标准和手术成功标准进

行筛选, 保证每组 15 只成功模型。

### 2.1 神经行为功能评分

采用秩和检验 (K-W 检验) 结果显示, 实验对象在麻醉醒后 2 h、再灌注 6 h、再灌注 24 h 在不同浓度的 A、B、C、D 组中的神经行为功能评分无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

### 2.2 脑梗塞体积所占百分比的测定

采用方差分析 (ANOVA) 结果显示, A、B、C、D 组的 TTC 染色及脑梗塞体积梗死百分比无统计学意义 ( $F = 0.613$ ,  $P = 0.612$ )。

### 2.3 脑组织含水量的测定

采用方差分析 (ANOVA) 结果显示, A、B、C、D 组的脑组织含水量的差异有统计学意义

( $F = 15.796$ ,  $P < 0.01$ )。进行 LED 两两比较后, A、B、C3 组脑组织含水量均高于 D 组, 即 D 组脑组织含水量最低 (A 组与 D 组:  $t = -6.12$ ,  $P < 0.01$ ; B 组与 D 组:  $t = -5.67$ ,  $P < 0.01$ ; C 组与 D 组:  $t = -4.08$ ,  $P < 0.01$ )。A 组含水量高于 C 组 ( $t = -2.03$ ,  $P = 0.049$ ), 见表 2。

### 2.4 中性粒细胞浸润每视野浸润个数 (个)

经收集整理数据并统计处理得出 4 组的均数 ( $\bar{x} \pm s$ ) 分别为  $9.90 \pm 3.3$ ;  $9.90 \pm 3.98$ ;  $9.70 \pm 3.80$ ;  $9.0 \pm 3.68$ 。采用方差分析 (ANOVA) 结果显示, A、B、C、D 组的中性粒细胞浸润不存在统计学意义 ( $F = 0.133$ ,  $P = 0.940$ )。

表 1 4 组大鼠术后神经行为功能评分 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of nerve function scores in rats after operation among the four groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	麻醉醒后 2 h	再灌注 6 h	再灌注 24 h
A 组	$1.0 \pm 2.25$	$1.0 \pm 1.50$	$1.0 \pm 0.5$
B 组	$1.0 \pm 1.25$	$1.0 \pm 2.0$	$1.0 \pm 0.25$
C 组	$1.0 \pm 2.25$	$0.5 \pm 1.25$	$1.0 \pm 0.25$
D 组	$1.0 \pm 3.25$	$1.0 \pm 2.0$	$1.5 \pm 1.0$

表 2 4 组大鼠脑梗塞体积百分比及脑组织含水量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Comparison of the cerebral infarction volume percentage and the water conten in brain tissue among the four groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	梗死率 (%)	脑组织含水量 (%)
A 组	$26.72 \pm 4.92^*$	$78.62 \pm 1.95^*$
B 组	$28.42 \pm 4.08^*$	$78.18 \pm 2.42^*$
C 组	$29.16 \pm 3.70^*$	$76.58 \pm 2.02^*$
D 组	$27.20 \pm 3.14$	$72.50 \pm 1.41$

与 D 组比较,  $*P < 0.05$ 。

## 3 讨论

脑卒中是当今世界最重要的致死性疾病之一, 而在脑卒中中, 缺血性中风占 80% 以上。临床上处理脑缺血性损伤的原则是尽早恢复血液再灌注, 但由于脑缺血再灌注损伤的存在使得脑组织的功能障碍和结构损伤更严重, 死亡率更高, 大大降低了治疗效果, 引起世人的广泛关注。随着高渗盐水的抗炎效应逐渐为大家所认识, 并成功应用于休克、感染等多种危重病的抢救与治疗。而在神经外领域, 大多数的患者同时往往因颅脑病变致颅内压升

高而需脱水治疗或病变本身 (垂体瘤, 颅咽管瘤等) 而致水电解质紊乱常需用高渗盐水补液。同时, 临床上多次大量使用甘露醇是无益的, 反而可能发生反跳性颅内压升高。现已有学者提出甘露醇最好在病情急需时短期使用。而高渗盐水由于其翻转系数高于甘露醇, 比甘露醇更难通过血脑屏障进入脑组织, 不易在脑组织中蓄积, 也不易发生反跳性颅内压升高, 是种更为有利的渗透性脱水剂。

本研究选择 SD 大鼠大脑中动脉缺血 (MACO) 再灌注建立局灶性脑缺血再灌注动物模型, 其操作方便, 损伤小, 成本低, 可重复性及稳定性好, 能较好地模仿人类脑梗死发病的病理过程, 通过不同浓度的高渗盐水应用进行差异比较分析, 为高渗盐水在脑缺血再灌注损伤的临床应用提供科学依据及参考数据, 对临床治疗急性脑缺血再灌注损伤及合理使用高渗盐水具有重要现实意义。

高渗盐水 (hypertonic saline, HS) 是指渗透压超过人体正常值, 浓度大于 0.9% 的盐水。Suarez 在用 23.4% 高渗盐水治疗 20 人次的颅内高压症时, 发现在 20 min 左右, 有 16 人次的颅内压力下降 50% 以上, 同时患者的脑血流灌注压升高, 血钠浓度、平均动脉压、尿量无明显变化, 效果不亚于甘露醇。高渗盐水脱水降颅压作用被引起重视, 并开

始重新评价<sup>[9]</sup>。随着高渗盐水的抗炎效应逐渐为大家所认识,并应用于休克、感染等多种危重病的抢救与治疗。Attuwaybi等<sup>[10]</sup>发现,高渗盐水预处理可明显抑制出血性休克肺中中性粒细胞的聚集,减轻肺水肿和组织损伤;有学者把高渗盐水誉为创伤治疗中的新型免疫调节剂<sup>[11]</sup>。尽管目前研究显示高渗盐水在神经科的应用具有巨大的潜在价值,但目前临床还未推荐常规使用,原因在于高渗盐水使用对患者也有潜在的危险。据报道,其不良反应有神经系统 and 外周系统的表现。神经系统并发症主要是由血清钠和渗透压迅速变化产生的昏迷、抽搐、中枢性桥脑脱髓鞘(central pontine-myelinolysis, CPM)、硬膜下血肿等。大量高渗盐水注入有可能会引起红细胞皱缩引起溶血。

本实验从神经功能评分、脑梗死体积及脑含水量的测定、脑梗塞区中性粒细胞的浸润情况4个方面对4种不同浓度盐水进行比较分析,评估高渗盐水治疗作用的同时选出合适的治疗浓度。结果3种不同浓度的高渗盐水与生理盐水相比,其对缺血再灌注损伤后缺血灶体积的变化、周边炎症反应以及缺血造成的神经功能损伤的作用无显著差异。3种不同浓度高渗盐水的减轻脑水肿的作用要强于生理盐水,其中D组(23.5%)的作用又要强于其他2组。但本实验从模型制作到术后评分、观测指标等均有许多需要改善的地方,如模型脑缺血再灌注损伤的严重程度不一、样本量少等等,另外,盐水注入方式(鼠尾静脉注射)的效果不稳定,盐水注射的时间、量也有值得再深入探讨的价值。实验结果只能说明在本实验条件下,D组(23.5%)的减轻脑组织含水量的作用较明显。具体哪种浓度的盐水更适合治疗缺血再灌注脑损伤还需要通过加大样本量,增加观测指标种类等措施做进一步研究。

## [参考文献]

- [1] 薛胜祥,李英霞. 高渗盐水在神经科应用的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志,2009,14(1):61-62.
- [2] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Jap stroke, 1989, 20(1):84.
- [3] 胡建鹏,王键. 线栓法大鼠局灶性脑缺血模型研究中的几个问题[J]. 中国比较医学杂志,2004,2:115-118.
- [4] 武强,朱文元,王涛,等. 改良线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的实验研究[J]. 中国临床神经外科杂志,2009,3:162-165.
- [5] BEDERSON J B, PITTSLS H, TSUJIM, et al. Rat middle cerebral artery occlusion evaluation of model and development of a nuglogic examination [J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [6] ZEA LONGA E, WEISTEIN P R, CSLSON S E. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [7] 杨渊. 光化学诱导老年大鼠局灶性脑梗死模型的研究[J]. 中国老年学杂志,2001,1:35.
- [8] SHEN Y W, ZHU Z F, GHANG J C. Observation on the effect of  $\beta$ -sodium aescin intracerebral hemorrhage [J]. Hebei Med, 1999, 5:9-11.
- [9] PROUGH D S, ZORNOW M H. Mannitol:an old friend in the skids[J]. Crit Care Med, 1998, 26:997-998.
- [10] ATTUWAYBI B, KOZAR R A, GATES K S, et al. Hypertonic saline prevents inflammation, injury, and impaired intestinal transit after gut ischemia/reperfusion by inducing hemeoxygenase enzyme [J]. J Trauma, 2004, 56 (4): 749-758.
- [11] ROTSTEIN O D. Novel strategies for immunomodulation after trauma:revisiting hypertonic saline as a resuscitation strategy for hemorrhagic shock [J]. J Trauma, 2000, 49 (4):580-583.

(2012-02-13 收稿)