

## 猴脑严重缺血后选择性脑深低温灌注对神经功能的影响

刘博虎<sup>1)</sup>, 尹芳<sup>2)</sup>, 岑键昌<sup>1)</sup>, 刘俊<sup>1)</sup>, 蒲军<sup>2)</sup>

(1) 昆明市第一人民医院神经外科, 云南昆明 650034; 2) 昆明医科大学第二附属医院, 云南昆明 650101)

**[摘要]** **目的** 探讨严重脑缺血后行选择性脑深低温灌注对神经功能的影响。 **方法** 恒河猴 9 只, 常温下阻断双侧颈总动脉 10 min 后行选择性脑深低温灌注 60 min, 实验动物自然复温。术后 3 d 以实验动物的中枢神经功能评分表为标准进行神经功能缺失评分, 以后每周评分 1 次, 共 12 周。 **结果** 术后 3 d 评价 (13.56 ± 1.81), 部分实验动物出现昏迷、嗜睡、跛行等情况, 需要人工饲养生存, 术后两周评价实验动物神经功能评分 (16.11 ± 1.76), 均可独立存活。与术前比较, 实验动物术后 3 d 神经功能评分明显降低, 于术后 1 周开始逐渐升高, 术后 3 d 至术后 6 周与术前组两两比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 术后第 7 周~术后 12 周与术前比较差异无学意义 ( $P > 0.05$ )。 **结论** 恒河猴严重脑缺血后行选择性脑深低温灌注, 术后实验动物未出现严重脑缺血导致的偏瘫、昏迷、植物状态生存甚至死亡等情况, 可以明显改善脑缺血的预后。

**[关键词]** 恒河猴; 选择性脑灌注; 深低温; 神经功能

**[中图分类号]** R651.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 03-0018-05

## Effect of Selective Cerebral Deep Hypothermic Perfusion on the Neurological Function of Rhesus Monkey after Severe Brain Ischemia

LIU Bo-hu<sup>1)</sup>, YIN Fang<sup>2)</sup>, CEN Jian-chang<sup>1)</sup>, LIU Jun<sup>1)</sup>, PU Jun<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Neurosurgery, The 1st People's Hospital of Kunming City, Kunming Yunnan 650034; 2) The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of selective cerebral deep hypothermic perfusion on the neurological function of rhesus monkey after severe brain ischemia. **Methods** Nine rhesus monkeys were given blocking bilateral common carotid arteries for 10 min at room temperature, and then keeping selective cerebral deep hypothermic perfusion for 60 mins, and then giving natural rewarming. After three days, the experimental animal central nervous function scale was used to evaluate the nerve function every week for 12 weeks. **Results** After three days evaluation (13.56 ± 1.81), part of the experimental animals had such symptoms as coma, lethargy, lameness, etc., and needed to survive in captivity. After two weeks neurological evaluation (16.11 ± 1.76), animals could survive independently. Compared with before operation, the neurological function in experimental animals was significantly lower 3 days after operation, and was gradually increased 1 week after operation. There were statistically significant differences in the neurological function score between 3 days - 6 weeks after operation and before operation ( $P < 0.05$ ), but no statistically significant difference between 7 to 12 weeks after operation and before operation ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** Selective cerebral deep hypothermic perfusion after severe brain ischemia in Rhesus monkeys can significantly avoid severe hemiplegia, coma, vegetative state survival or death caused by cerebral ischemia, and can significantly improve the prognosis of cerebral ischemia.

**[Key words]** Rhesus monkey; Selective cerebral perfusion; Deep hypothermia; Neurological function

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81460174); 昆明医科大学研究生创新基金资助项目 (2013S17)

**[作者简介]** 刘博虎 (1986~), 男, 河北廊坊市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事神经重症及神经电生理研究工作。

**[通讯作者]** 蒲军. E-mail:pujun303@yahoo.com.cn

脑卒中是危害人类身体健康和生命的主要疾病之一, 是目前世界上仅次于心血管疾病和癌症的第三大死亡原因<sup>[1]</sup>, 2008年我国卫生部公布的第三次全国死亡原因调查显示: 目前脑卒中已超过恶性肿瘤, 在致死病因中排第一位, 且是严重和长期致残的主要原因<sup>[2-3]</sup>. 近10 a来, 低温在人类神经系统急性缺血性脑损伤中的积极作用被越来越多地认识到. 在迄今为止的实验室研究中, 低温技术是最有效的神经保护方法. 研究证实, 低温通过抑制或刺激多种因素最终发挥保护作用和改善患者预后<sup>[2-4]</sup>.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

恒河猴9只(购于中国科学院昆明动物研究所), 雄性, 神经功能评价20分, 年龄5~8岁, 平均(5.90±1.62)岁, 体重8.1~12.4 kg, 平均(10.25±2.15) kg.

### 1.2 实验方法

**1.2.1 模型建立** 术前晚禁饮禁食, 以盐酸氯胺酮(10 mg/kg)和安定(0.5 mg/kg)肌注, 诱导麻醉成功后, 取仰卧、颈部过伸位, 头、颈部双侧腹股沟区备皮. 浅静脉置管, 泵入异丙酚[0.1~0.2 mg/(kg·min)]持续静脉麻醉. 气管插管, 维持自主呼吸(100%氧气). 留置导尿管记录尿量, 放置直肠温度计并记录中心体温. 连接多导联生理监护仪. 分离右侧股动静脉置入深静脉导管. 右侧股总动脉近心端置管监测平均动脉压. 结扎右侧颈总动脉, 右侧颈内动脉远心端置入导管, 连接灌注降温系统, 右侧颈内静脉远心端及右侧股静脉近心端置管, 连接超滤复温系统的输入端, 左侧股静脉近心端置管连接超滤复温系统的输出端(图1). 右侧颈内静脉近心端置管, 监测中心静脉压. 分离出左侧颈总动脉、左侧颈内外静脉和右侧颈外静脉. 右额部钻孔, 插入针形脑温传感器, 牙科水泥固定后, 连接脑温监测仪. 备乳酸林格氏液4 000 mL(4.0±0.5℃). 夹闭双侧颈总动脉、颈内静脉10 min.

静注肝素(50 IU/kg)抗凝, 经冷灌注系统自右颈内动脉输入(4.0±0.5)℃林格氏液, 维持动脉压及中心静脉压在正常范围, 同时自右侧颈内静脉远心端及右侧股静脉近心端回流, 超滤去除多余水分后复温至38℃, 自左侧股静脉近心端回输至体循环. 待脑温降至≤16℃后, 降低冷灌注速率, 保持脑温在15.7℃~18℃之间, 维持60 min. 术中临时静推速尿, 防止水潴留.

停止冷灌注, 恢复正常血流, 使脑组织自然复温. 滤除多余水分, 保持中心静脉压不超过12 cmH<sub>2</sub>O. 静脉应用鱼精蛋白(1:1), 中和肝素. 术区分层缝合. 肛温恢复至35℃、呼吸平稳、呛咳反射恢复后, 拔除气管插管, 严密监测, 直至恢复自然状态.

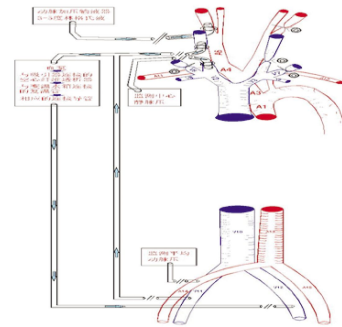


图1 猴脑严重缺血后脑选择性深低温复苏模式

Fig. 1 The map of selective cerebral deep hypothermic perfusion

A1 升主动脉 A2 主动脉弓 A3 总干 A4 头臂干 A5 左侧颈总动脉 A6 右侧颈总动脉 A7 右侧颈内动脉 A8 左侧颈内动脉 A9 右侧颈外动脉 A10 左侧颈外动脉 A11 右侧锁骨下动脉 A12 左侧锁骨下动脉 A13 腹主动脉 A14 右股动脉 A15 左股动脉 V1 上腔静脉 V2 右侧头臂静脉 V3 左侧头臂静脉 V4 右侧颈内静脉 V5 左侧颈内静脉 V6 右侧颈外静脉 V7 左侧颈外静脉 V8 右侧锁骨下静脉 V9 左侧锁骨下静脉 V10 下腔静脉 V11 右股静脉 V12 左股静脉.

**1.2.2 神经功能评分及标本处理** 以实验动物的中枢神经功能评分表(见表1)为标准进行神经功能缺失评分<sup>[10]</sup>, 术后3 d神经功能评分, 以后每周评价一次, 共12周.

表1中上述神经功能评分法主要用于评价犬、猪、猴、狒狒等大动物. 满分为20分, 其中18~20为正常, 13~17分为可独立生存状态, 8~12分为人工饲养生存状态, 7分以下为濒死状态, 分值越低, 神经功能障碍越显著.

**1.2.3 标本处理** 饲养12周后, 麻醉开胸处死, 4%多聚甲醛2 000 mL自左心室注入, 取出全脑、心、肺、肝及肾等组织, 10%甲醛固定液固定. 经梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 切片(片厚5 μm), HE染色, 光学显微镜观察.

### 1.3 统计学处理

用SPSS统计软件进行统计分析, 采用自身对照的方法比较, 所有定量数据采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示. 资料满足正态分布, 方差齐, 多组

均数的比较采用单因素方差分析 (One Way ANOVA), 对有差异者再进行 LSD 法进行均数间的两两比较,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 神经功能评分

评分结果以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示 (见表 2)。术后 3 d 评价 ( $13.56 \pm 1.81$ ), 部分实验动物出现一定程度的昏迷、嗜睡、跛行等情况, 需要人工饲养生存, 术后两周评价实验动物神经功能评分 ( $16.11 \pm 1.76$ ), 均可独立存活。与术前比较, 实验

动物术后 3 d 神经功能评分明显降低, 于术后 1 周开始逐渐升高, 术后 3 d 至术后 6 周与术前组两两比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 术后第 7 周至术后 12 周与术前比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 病理学观察

额叶皮层、皮质髓质交界及海马少量细胞核溶解、碎裂, 尼氏小体消失, 其余部位脑组织结构正常 (图 2~5); 心、肺、肝、肾等脏器组织 HE 染色示组织结构正常, 细胞形态未见异常 (图 6~9)。

表 1 大动物神经功能评分表

Tab. 1 The experimental animal central nervous function scale

项 目	3 分	2 分	1 分	0 分
意识状态	清醒	嗜睡	昏迷	深昏迷
运动	正常行走	跛行 (轻瘫)	不能站立	不动
肌张力	正常	增高	减弱	无张力
饮食	-	自己进食	仅有进食反应	无反应
视力	正常观看	有视反应	有瞳孔光反应	无
疼痛反应	-	灵敏	迟钝	无反应
排尿	-	正常	尿失禁	尿潴留
排便	-	正常	大便失禁	不能排便

表 2 恒河猴神经功能评分 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 The nervous function score of Rhesus monkey

组 别	( $\bar{x} \pm s$ )	神经功能评分
术前	9	20.00 $\pm$ 0.00
术后 3 d	9	13.56 $\pm$ 1.81 <sup>▲</sup>
术后 1 周	9	14.78 $\pm$ 2.05 <sup>▲</sup>
术后 2 周	9	16.11 $\pm$ 1.76 <sup>▲</sup>
术后 3 周	9	17.00 $\pm$ 1.50 <sup>▲</sup>
术后 4 周	9	17.44 $\pm$ 2.01 <sup>▲</sup>
术后 5 周	9	17.89 $\pm$ 2.03 <sup>▲</sup>
术后 6 周	9	18.22 $\pm$ 1.86 <sup>▲</sup>
术后 7 周	9	18.67 $\pm$ 1.50
术后 8 周	9	18.89 $\pm$ 1.45
术后 9 周	9	19.11 $\pm$ 1.27
术后 10 周	9	19.27 $\pm$ 1.03
术后 11 周	9	19.44 $\pm$ 1.13
术后 12 周	9	19.56 $\pm$ 0.89

与术前比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ 。

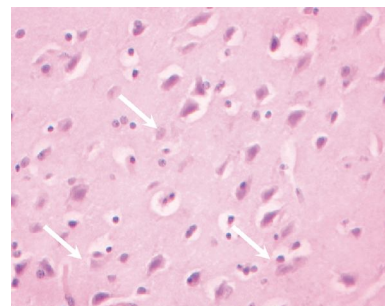


图 2 额叶皮层少量神经细胞坏死核溶解, 核碎裂 ( $\times 400$ )  
Fig. 2 Small amount of nerve cell death in the frontal cortex, and karyolysis, karyorrhexis appeared ( $\times 400$ )

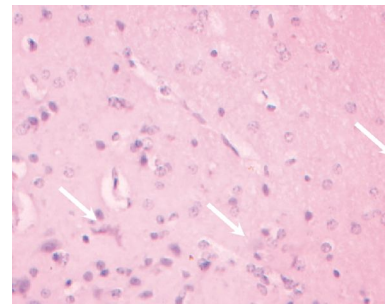


图 3 皮髓交界少量神经细胞坏死, 核溶解, 核碎裂 ( $\times 400$ )  
Fig. 3 Small amount of nerve cell death in the frontal cortico-medullary border, and karyolysis karyorrhexis appeared ( $\times 400$ )

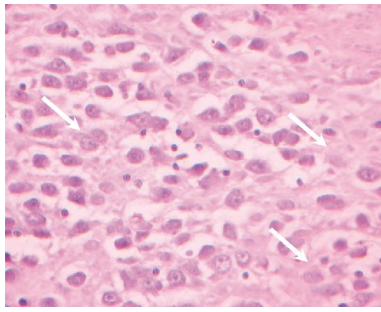


图 4 海马少量神经细胞核溶解、核碎裂 (×400)  
**Fig. 4 Fig.4 A small amount of nerve cell death in the frontal hippocampus , and karyolysis, karyorrhexis appeared (×400)**

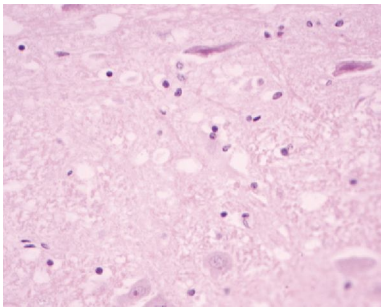


图 5 延髓结构正常,未见异常改变 (×400)  
**Fig. 5 Medulla oblongata structure is normal, no abnormal change (×400)**

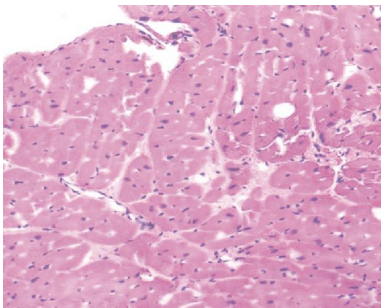


图 6 心肌结构正常, 未见异常改变 (×200)  
**Fig. 6 Myocardial structure is normal, no abnormal change (×200)**

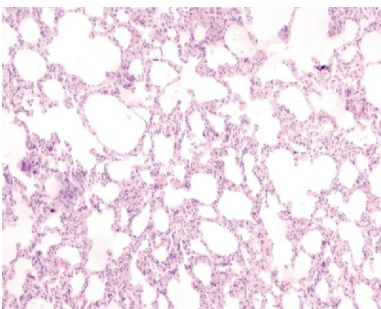


图 7 肺脏结构正常, 未见异常改变 (×100)  
**Fig. 7 The lungs oblongata structure is normal, no abnormal change (×100)**

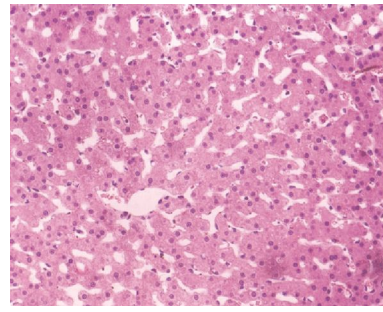


图 8 肝脏结构正常, 未见异常改变 (×200)  
**Fig. 8 The liver structure is normal, no abnormal change (×200)**

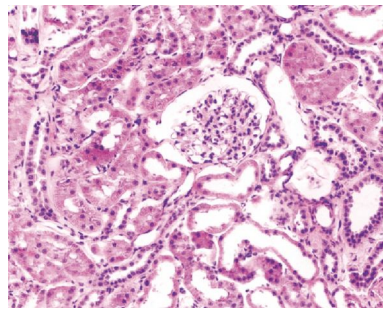


图 9 肾脏结构正常, 未见异常改变 (×200)  
**Fig. 9 Kidney oblongata structure is normal, no abnormal change (×200)**

### 3 讨论

大量的动物及临床研究表明, 低温能够抑制细胞内需氧酶的活性, 降低组织代谢率, 减少组织耗氧量, 抑制氧自由基和过氧化物的合成, 抑制兴奋性神经递质的释放, 降低  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶活性, 维持血脑屏障和细胞膜的稳定<sup>[5,6]</sup>。

1975 年 barratt-boyes 首次将深低温停循环 (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) 应用于先天性心脏病的修复手术中, 目前已被广泛应用于主动脉弓和胸主动脉手术中<sup>[7-9]</sup>。DHCA 可以为心胸外科医生提供一个无血的手术视野, 而且低温状态还可以降低组织的代谢率, 提供一定程度的神经保护效用。然而, DHCA 是一把“双刃剑”, 长时间的深低温停循环后会导致神经损伤, 停循环持续时间超过 45 min, 发病率和死亡率明显增加, 术后早起及中远期神经系统并发症明显增加<sup>[10]</sup>。

2002 年江基尧、徐蔚等已成功的构建了恒河猴选择性脑深低温复苏的动物模型, 在选择性脑深低温条件下行脑缺血 60 min 后成功复苏, 延长了脑组织耐受缺血缺氧的安全时限, 并证实选择性脑深低温对恒河猴神经元超微结构及心肺等内脏器官无明显病理损害<sup>[11-14]</sup>, 对脑干功能无明显影响, 未

发现明显病理改变<sup>[15]</sup>。本实验在江基尧等实验的动物模型基础上,常温下阻断双侧颈总动脉 10 min 造成脑组织严重缺血,模拟临床心跳呼吸骤停,缺血 10 min 后行选择性猴脑深低温灌注。

本实验脑组织不同部位切片病理学检查提示仅皮层、灰白质交界区及海马发现少量细胞肿胀坏死、细胞核碎裂溶解,较缺血性脑损伤导致的大量神经元肿胀、变性、坏死明显不同。术后实验动物未出现严重脑缺血导致的偏瘫、昏迷、植物状态生存甚至死亡等情况,术后 3 d 评价(13.56 ± 1.81),部分实验动物出现一定程度昏迷、嗜睡、跛行等情况,需要人工饲养生存,术后两周评价实验动物神经功能评分(16.11 ± 1.76),均可独立存活。因此,笔者认为恒河猴严重脑缺血后行选择性脑深低温灌注可以明显改善脑缺血的预后。

#### [参考文献]

- [1] GINSBERG M D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55 (3): 363 - 389.
- [2] A. Durukan and t. Tatlisumak. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2007, 87 (1): 179 - 197.
- [3] VMURRAY, BNORRVING, PAGESANDERCOCK, et al. The molecular basis of thrombolysis and its clinical application in stroke [J]. *Journal of Internal Medicine*, 2010, 267(2): 191 - 208.
- [4] JMWEINBERGER. Evolving therapeutic approaches to treating acute ischemic stroke [J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2006, 249(2): 101 - 109.
- [5] LIU L, YENARI M A. Clinical application of therapeutic hypothermia in stroke [J]. *Neurological Research*, 2009, 31(4): 331 - 335.
- [6] LYDEN P D, KRIEGER D, YENARI M, et al. Therapeutic hypothermia for acute stroke [J]. *International Journal of Stroke*, 2006, 1(1): 9 - 19.
- [7] KOUCHOUKOS N T, MASETTI P, ROKKAS C K, et al. Hypothermic cardiopulmonary bypass and circulatory arrest for operations on the descending thoracic and thoracoabdominal aorta [J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, 74: (1 885): 1 892 - 1 898.
- [8] LEMAIRE S A, CARTER S A, COSELLI J S. The elephant trunk technique for staged repair of complex neurosyms of the entire thoracic aorta [J]. *Ann Thorac Surg*, 2006, 81: 1 561 - 1 569.
- [9] NIAZI S A, LEWIS F J. Profound hypothermia in man: report of a case [J]. *Ann Surg*, 1958, 147: 264 - 266.
- [10] KOUCHOUKOS, DOTY, HANLEY, et al. Hypothermic, e-circulatory arrest, and cardiopulmonary [J]. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003, 3(1): 66 - 69.
- [11] 徐蔚, 高永军, 江基尧, 等. 猴脑选择性深低温断血流复苏实验模型的建立 [J]. *中华神经医学杂志*, 2005, 4 (2): 126 - 129.
- [12] 徐蔚, 江基尧, 杨朋范, 等. 选择性深低温断血流对猴神经功能及神经元超微结构的影响 [J]. *中华外科杂志*, 2004, 42(8): 486 - 488.
- [13] JIANG J Y, XU W, YANG P F, et al. Marked protection by selective cerebral profound hypothermia after complete cerebral ischemia in primates [J]. *J Neurotrauma*, 2006, 23(12): 1 847 - 1 856.
- [14] LIANG Y M, JIANG J Y, MAO Q, et al. Therapeutic window of selective profound cerebral hypothermia for resuscitation of severe cerebral ischemia in primates [J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(11): 2 107 - 2 112.
- [15] 高永军, 徐蔚, 冯忠堂, 等. 选择性深低温阻断血流对脑干功能和形态的影响 [J]. *中国现代神经病杂志*, 2005, 5(1): 40 - 44.

(2015 - 01 - 25 收稿)