

# 羟乙基淀粉 130/0.4 对全脑缺血-再灌注损伤大鼠血-脑屏障的影响

叶伟光 王天龙

**【摘要】** 目的 观察6%羟乙基淀粉130/0.4对全脑缺血-再灌注损伤大鼠血-脑屏障通透性的影响,并探讨其可能的作用机制。方法 采用三血管阻断法建立大鼠全脑缺血-再灌注损伤模型,分别于全脑缺血前10 min、脑缺血10 min、再灌注后10 min采集股动脉血检测动脉血氧分压和二氧化碳分压;干湿重法计算脑组织含水量,伊文蓝渗出量评价血-脑屏障通透性,免疫组织化学染色和酶联免疫吸附试验检测核因子- $\kappa$ Bp65活性和脑组织匀浆肿瘤坏死因子- $\alpha$ 质量浓度。结果 手术前后不同观察时间点、不同处理组之间比较,动脉血氧分压和二氧化碳分压差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。单纯缺血组、生理盐水组和羟乙基淀粉组大鼠脑组织核因子- $\kappa$ Bp65表达水平升高,免疫组织化学评分(IHS)增加(均 $P = 0.000$ ),其中羟乙基淀粉组大鼠两项指标显著低于其他两组(均 $P = 0.000$ )。缺血-再灌注损伤后,单纯缺血组和生理盐水组大鼠脑组织含水量和血-脑屏障通透性显著高于羟乙基淀粉组(均 $P = 0.000$ ),而羟乙基淀粉组此两项检测指标均接近正常值范围( $P > 0.05$ )。结论 6%羟乙基淀粉130/0.4能够改善大鼠全脑缺血-再灌注损伤时的血-脑屏障功能,降低其通透性,减轻脑水肿,具有一定的脑保护作用;其作用机制与抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和核因子- $\kappa$ Bp65表达、减轻炎性损伤有关。

**【关键词】** 再灌注损伤; 血脑屏障; 羟乙基淀粉; 免疫组织化学; 酶联免疫吸附测定; 疾病模型, 动物

DOI: 10.3969/j.issn.1672-6731.2010.04.014

**Effect of hydroxyethyl starch 130/0.4 on blood-brain barrier in rats after global cerebral ischemia-reperfusion** YE Wei-guang, WANG Tian-long. Department of Anesthesiology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Corresponding author: WANG Tian-long (Email: wangteng1992@hotmail.com)

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of hydroxyethyl starch (HES) 130/0.4 on global cerebral ischemia - reperfusion in rats, and to investigate the underlying mechanism of HES130/0.4. **Methods** Forty - eight Sprague - Dawley (SD) rats were divided randomly into 4 groups, namely sham operation group (S group), ischemia-reperfusion group (IR group), normal saline (NS) + IR group (NS group) and HES130/0.4 + IR group (HES group). The blood gas analysis was performed during the experiment. The content of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Evans blue (EB), brain water content and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activity in brain tissue were determined at 12 h after the experiment. **Results** No significant differences of arterial partial pressure of oxygen (PaO<sub>2</sub>) and partial pressure of carbon dioxide (PaCO<sub>2</sub>) in every group were seen at different observation time before and after operation ( $P > 0.05$ , for all). NF- $\kappa$ Bp65 expression and Immunohistochemical Score (IHS) of brain tissue were all increased in IR group, NS group and HES group ( $P = 0.000$ , for all), while NF- $\kappa$ Bp65 expression and IHS score in HES group were lower than those in other 2 groups ( $P = 0.000$ , for all). After ischemia-reperfusion injury, brain water content and blood-brain barrier (BBB) permeability in IR group and NS group were all significantly higher than those in HES group ( $P = 0.000$ , for all), while the 2 indices in HES group were all nearly approaching to normal range ( $P > 0.05$ , for all). **Conclusion** HES130/0.4 can alleviate ischemia - reperfusion BBB injury in ischemia-reperfusion rats. HES130/0.4 has cerebral protective effect, and the underlying mechanism may concerned with the decrease of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B expression and attenuation of inflammatory injury.

**【Key words】** Reperfusion injury; Blood - brain barrier; Hetastarch; Immunohistochemistry; Enzyme-linked immunosorbent assay; Disease models, animal

作者单位:100053 北京,首都医科大学宣武医院麻醉科

通信作者:王天龙(Email:wangteng1992@hotmail.com)

血-脑屏障(BBB)是存在于脑组织与血液之间的复杂细胞系统,由脑血管内皮细胞、基底膜、星形细胞终足所组成,在维持中枢神经系统的正常功能中发挥重要作用。当血-脑屏障被破坏时,血浆成分外渗形成脑水肿,因此,保护血-脑屏障的完整性是减轻脑损伤的重要措施之一。人造血浆代用品 6% 羟乙基淀粉 130/0.4(HES130/0.4)为新一代羟乙基淀粉,经对其相对分子质量、取代级和取代方式的改进及优化组合使其临床应用更加有效、安全<sup>[1]</sup>。在本实验中,我们采用 6% 羟乙基淀粉 130/0.4 治疗全脑缺血-再灌注损伤大鼠模型,假设该治疗能够减轻大鼠全脑缺血-再灌注血-脑屏障损伤并抑制脑组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的表达,探讨其作用机制,拟为神经外科手术过程中液体治疗的选择提供理论依据。

## 材料与方 法

### 一、材料

1. 实验动物及分组 清洁级雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 48 只,鼠龄 2~3 个月,体质量为(300±23)g。按随机数字表法分为假手术组(对照组)、缺血-再灌注组(单纯缺血组)、缺血-再灌注+生理盐水组(生理盐水组)、缺血-再灌注+羟乙基淀粉组(羟乙基淀粉组),每组各 12 只动物。(1)对照组:分离双侧颈总动脉,穿线但不阻断。(2)单纯缺血组:采用三血管阻断法<sup>[2]</sup>阻断双侧颈总动脉和基底动脉,缺血 10 min 后开放,再灌注 12 h。(3)生理盐水组:采用三血管阻断法阻断双侧颈总动脉和基底动脉,10 min 后再开放,于再灌注即刻经股静脉以 0.20 ml/min 速度输注生理盐水(液体在恒温水箱中预热至 37℃)5 ml/kg,再灌注 12 h。(4)羟乙基淀粉组:采用三血管阻断法阻断双侧颈总动脉和基底动脉,10 min 后再开放,于再灌注即刻经股静脉以 0.20 ml/min 速度输注 6% 羟乙基淀粉 130/0.4(液体在恒温水箱中预热至 37℃)5 ml/kg,再灌注 12 h。

2. 主要试剂与药品 免疫试剂中的 I 抗为核因子- $\kappa$ Bp65 抗大鼠 IgG 单克隆抗体(1:100),含生物素标记的山羊抗兔 IgG II 抗(未稀释)和辣根过氧化物酶标记链霉菌卵白素(1:100),以及二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒,均购自河北博海生物工程开发有限公司。伊文蓝(EB)试剂由河北博海生物工程开发有限公司提供。

### 二、实验方法

1. 全脑缺血-再灌注模型制备 (1)建立模型:采用三血管阻断法建立全脑缺血-再灌注模型。质量分数为 10% 水合氯醛(0.35 g/kg)腹腔注射麻醉大鼠,待翻正反射消失、钳夹尾部无体动反应后称体质量。大鼠固定于实验台,颅顶部右侧钻孔并安装电极,记录脑血流图变化。沿颈部正中中线切口,钝性分离颈部肌肉,行气管插管,保留自主呼吸,吸氧,显露双侧颈总动脉。钝性分离附着于斜坡上的肌肉和筋膜,显露斜坡,微型颅骨钻于斜坡上钻(3~4)mm×(4~5)mm 长方形骨窗并逐步扩大,分离基底动脉,显露第二无血管区穿线备用;显露股动脉和股静脉、穿刺置管,稳定 10 min,待心率、呼吸频率恢复至手术前,无创微动脉夹夹闭双侧颈总动脉,提线法阻断基底动脉,监测脑血流量变化,维持脑缺血 10 min,松开动脉夹和结扎线,恢复血流灌注 10 min,至脑血流图恢复波形。手术结束缝合切口,纱布包扎。(2)结果评价:大鼠结膜变白,呼吸急促,脑血流图呈直线。(3)观察项目:于大鼠全脑缺血前 10 min(T<sub>1</sub>)、脑缺血 10 min(T<sub>2</sub>)、再灌注后 10 min(T<sub>3</sub>)采集股动脉血检测动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)和二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)。

2. 干湿重法计算脑组织含水量 全脑缺血-再灌注后 12 h,质量分数为 10% 水合氯醛(0.35 g/kg)腹腔注射麻醉大鼠,迅速断头处死、冰盘上完整切取全脑,剥离中脑、脑桥、垂体等组织,留取大脑组织,滤纸吸干表面水分和脑脊液,HM-200 型电子天平(日本 AD 公司)称质量即为脑组织湿重,然后置 110℃ 烤箱内烘烤 24 h,再称取脑组织质量,即为干重。按照脑组织含水量计算公式:脑组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%,即为相对脑组织含水量。

3. 伊文蓝法检测血-脑屏障通透性 通过血管外伊文蓝渗出量评价血-脑屏障通透性。(1)标本制备:全脑缺血-再灌注后 12 h,质量分数为 10% 水合氯醛(0.35 g/kg)腹腔注射麻醉大鼠,尾静脉注射质量分数为 2% 伊文蓝生理盐水(4 ml/kg),开胸经左心室灌注生理盐水[灌注压 110 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)],直至右心房流出液体呈无色。断头取脑并称取质量,标本置于含质量分数为 50% 三氯乙酸(TCA)溶液 2 ml 的匀浆器中充分匀浆,质量分数为 50% 三氯乙酸稀释至 10 ml,温度 4℃,离心半径

15 cm、10 000 r/min 高速离心 20 min, 取上清液保存。(2)标准曲线制作:精确称取 5.00 mg 伊文蓝置 25 ml 量杯中,加生理盐水稀释至 25 ml。吸管汲取 0.30 ml 脑组织匀浆上清液,加入 5.70 ml 甲酰胺混匀配制第 1 管标准液,然后汲取 3.00 ml 第 1 管标准液,加入 3.00 ml 甲酰胺混匀作为第 2 管标准液,依此共配制 7 管标准液,其浓度分别为 9.46、4.73、2.37、1.18、0.60、0.30 和 0.15  $\mu\text{g/ml}$ 。50  $^{\circ}\text{C}$  水浴 48 h,于伊文蓝最大吸收峰处测定不同浓度(X 值)时伊文蓝溶液光密度值(OD 值,Y 值),根据所测数值求出直线回归方程 $[Y = -0.034 + 0.125X (r = 0.993)]$ ;752 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)检测伊文蓝于最大吸收光谱( $\lambda = 632 \text{ nm}$ )处光密度值,蒸馏水作为空白对照。根据伊文蓝与甲酰胺标准曲线获得每克脑组织伊文蓝精确质量浓度( $\mu\text{g/ml}$ )。

4. 免疫组织化学染色检测核因子- $\kappa\text{Bp}65$  表达 (1)标本制备:全脑缺血-再灌注后 12 h,质量分数为 10%水合氯醛(0.35 g/kg)腹腔注射麻醉大鼠,迅速断头处死,冰盘上完整切取全脑组织,剔除中脑、脑桥、垂体等组织,左侧大脑冷盐水冲洗后置质量分数为 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h,自视交叉冠状切取 5 mm 厚度脑组织块,逐级脱水至透明、浸蜡包埋,5  $\mu\text{m}$  厚连续切片,4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。(2)免疫组织化学染色(三步法):脑组织切片脱蜡至水,蒸馏水冲洗 5 min( $\times 3$ ),体积分数为 3%过氧化氢室温孵育 5 min 以消除内源性过氧化物酶,蒸馏水冲洗 5 min( $\times 2$ ),0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 5 min( $\times 3$ ),高压修复 6 min 后自然冷却至室温,0.10 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min( $\times 3$ ),滴加质量分数为 5%胎牛血清工作液封闭 20 min,再滴加核因子- $\kappa\text{Bp}65$  抗大鼠 IgG 单克隆抗体(I 抗),置 37  $^{\circ}\text{C}$  烤箱内反应 1 h,0.10 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min( $\times 3$ ),滴加生物素标记的山羊抗兔 IgG II 抗,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min,0.10 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min( $\times 3$ );滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(SA-HRP)工作液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min,0.10 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min( $\times 3$ );DAB 显色,充分水洗,终止显色反应,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明 5 min( $\times 2$ )、中性树脂封片。(3)结果评价:采用 HPIAS21000 型高清晰彩色病理图文分析系统(武汉千屏影像技术有限公司)检测不同处理组脑组织切片平均灰度值,据阳性细胞计数和阳性细胞显色强度(细

胞质和细胞核内出现棕黄色颗粒)行免疫组织化学评分(IHS)。A 级,阳性细胞计数共分为 5 级,0~1% 为 0 级,1%~10% 为 1 级,10%~50% 为 2 级,50%~80% 为 3 级,80%~100% 为 4 级;B 级,阳性细胞显色强度亦分为 4 级,0 级(阴性)、1 级(弱阳性)、2 级(阳性)和 3 级(强阳性)。IHS 评分 = A 级  $\times$  B 级。

5. 酶联免疫吸附试验检测脑组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达 全脑缺血-再灌注后 12 h,以质量分数为 10%水合氯醛(0.35 g/kg)腹腔注射麻醉大鼠,迅速断头处死,冰盘上完整切取全脑组织制成匀浆,离心半径 14 cm、3500 r/min 高速离心 10 min,取上清液液氮保存。标准蛋白质样品和待测样品同时加入包被核因子- $\kappa\text{Bp}65$  抗大鼠 IgG 单克隆抗体(I 抗)的 96 孔板中,严格按照试剂盒说明书要求进行操作,于 450 nm 波长处测定光密度值;根据已知浓度的标准蛋白质光密度值绘制标准曲线,并计算不同处理组待测样品中肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达水平(ng/ml)。

### 三、统计分析方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据计算与分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,不同处理组之间均数的比较分别行重复测量设计和单因素方差分析,两两比较行  $q$  检验。以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

不同处理组大鼠在所有观察时间点动脉血氧分压和二氧化碳分压,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ;表 1,2)。

### 一、脑组织核因子- $\kappa\text{Bp}65$ 表达变化

免疫组织化学检测显示,与对照组比较,单纯缺血组、生理盐水组和羟乙基淀粉组大鼠脑组织核因子- $\kappa\text{Bp}65$  表达水平升高( $q = 9.520$ 、 $8.967$ 、 $7.070$ , 均  $P = 0.000$ )、IHS 评分增加( $q = 23.503$ 、 $21.070$ 、 $15.968$ , 均  $P = 0.000$ ;表 3);但羟乙基淀粉组大鼠核因子- $\kappa\text{Bp}65$  表达水平( $q = 6.216$ 、 $8.523$ , 均  $P = 0.000$ )和 IHS 评分( $q = 14.530$ 、 $15.614$ , 均  $P = 0.000$ ;表 3)低于单纯缺血组和生理盐水组。结果提示:6%羟乙基淀粉 130/0.4 可抑制核因子- $\kappa\text{B}$  的表达。

### 二、脑组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ 表达变化

酶联免疫吸附试验(ELISA)检测显示,与对照组相比,单纯缺血组、生理盐水组和羟乙基淀粉组大鼠再灌注后脑组织匀浆肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达水平



**表 1** 不同处理组大鼠动脉血氧分压和二氧化碳分压的比较( $\bar{x} \pm s$ , mm Hg)

| 组别                      | 样本例数 | T <sub>1</sub> | T <sub>2</sub> | T <sub>3</sub> |
|-------------------------|------|----------------|----------------|----------------|
| <b>PaO<sub>2</sub></b>  |      |                |                |                |
| 对照组                     | 12   | 221.41 ± 12.52 | 221.51 ± 11.73 | 220.32 ± 11.72 |
| 单纯缺血组                   | 12   | 221.42 ± 13.71 | 221.56 ± 12.12 | 220.34 ± 10.76 |
| 生理盐水组                   | 12   | 221.52 ± 11.54 | 221.42 ± 10.68 | 220.28 ± 11.21 |
| 羟乙基淀粉组                  | 12   | 221.52 ± 12.62 | 221.35 ± 10.82 | 220.30 ± 11.11 |
| <b>PaCO<sub>2</sub></b> |      |                |                |                |
| 对照组                     | 12   | 53.51 ± 2.92   | 54.23 ± 2.41   | 54.25 ± 2.56   |
| 单纯缺血组                   | 12   | 53.64 ± 3.12   | 54.28 ± 2.72   | 53.78 ± 2.32   |
| 生理盐水组                   | 12   | 54.15 ± 2.61   | 54.31 ± 2.81   | 54.35 ± 2.14   |
| 羟乙基淀粉组                  | 12   | 54.22 ± 2.58   | 54.40 ± 2.76   | 54.24 ± 2.32   |

注: PaO<sub>2</sub>, 动脉血氧分压; PaCO<sub>2</sub>, 二氧化碳分压; T<sub>1</sub>, 脑缺血前 10 min; T<sub>2</sub>, 脑缺血 10 min; T<sub>3</sub>, 再灌注后 10 min

**表 2** 不同处理组大鼠动脉血氧分压和二氧化碳分压的重复测量设计方差分析表

| 变异来源                    | SS      | df | MS     | F 值   | P 值   |
|-------------------------|---------|----|--------|-------|-------|
| <b>PaO<sub>2</sub></b>  |         |    |        |       |       |
| 处理                      | 15.861  | 3  | 5.287  | 0.241 | 0.867 |
| 测量时间                    | 28.167  | 2  | 14.083 | 0.338 | 0.746 |
| 处理 × 测量时间               | 106.722 | 6  | 17.787 | 0.564 | 0.583 |
| 组间误差                    | 723.972 | 33 | 21.939 |       |       |
| 组内误差                    | 419.667 | 22 | 19.076 |       |       |
| <b>PaCO<sub>2</sub></b> |         |    |        |       |       |
| 处理                      | 1.056   | 3  | 0.352  | 0.176 | 0.912 |
| 测量时间                    | 1.514   | 2  | 0.757  | 0.509 | 0.703 |
| 处理 × 测量时间               | 10.516  | 6  | 1.081  | 0.664 | 0.503 |
| 组间误差                    | 65.944  | 33 | 1.068  |       |       |
| 组内误差                    | 23.486  | 22 | 1.003  |       |       |

注: PaO<sub>2</sub>, 动脉血氧分压; PaCO<sub>2</sub>, 二氧化碳分压

增加( $q = 24.912、25.103、16.135$ , 均  $P = 0.000$ ; 表 4); 其中, 单纯缺血组和生理盐水组大鼠高于羟乙基淀粉组( $q = 8.675、9.135$ , 均  $P = 0.000$ ; 表 4)。结果提示: 6% 羟乙基淀粉 130/0.4 对肿瘤坏死因子- $\alpha$  活性具有抑制作用。

### 三、脑组织含水量和血-脑屏障通透性改变

脑组织含水量和血-脑屏障通透性测定结果显示, 与对照组比较, 单纯缺血组和生理盐水组大鼠脑组织含水量增加( $q = 9.212、10.614$ , 均  $P = 0.000$ ; 表 5), 血-脑屏障通透性增加( $q = 9.613、9.745$ , 均  $P = 0.000$ ; 表 5); 但羟乙基淀粉组与对照组之间差异无统计学意义( $q = 1.165, P = 0.903; q = 1.063, P = 0.942$ ; 表 5)。表明: 6% 羟乙基淀粉 130/0.4 可降低

**表 3** 不同处理组大鼠核因子- $\kappa$ Bp65 阳性细胞计数和免疫组织化学评分的比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 样本例数 | NF- $\kappa$ Bp65(灰度值) | IHS 评分      |
|--------|------|------------------------|-------------|
| 对照组    | 8    | 165.16 ± 8.76          | 0.50 ± 0.58 |
| 单纯缺血组  | 8    | 135.51 ± 3.87          | 5.00 ± 1.73 |
| 生理盐水组  | 8    | 134.21 ± 5.32          | 5.20 ± 1.42 |
| 羟乙基淀粉组 | 8    | 152.10 ± 7.56          | 2.20 ± 0.63 |
| F 值    |      | 256.018                | 24.006      |
| P 值    |      | 0.000                  | 0.000       |

**表 4** 不同处理组大鼠脑组织匀浆肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达水平的比较( $\bar{x} \pm s$ , ng/ml)

| 组别     | 样本例数 | TNF- $\alpha$ | F 值    | P 值   |
|--------|------|---------------|--------|-------|
| 对照组    | 8    | 1.97 ± 0.23   |        |       |
| 单纯缺血组  | 8    | 3.71 ± 0.40   | 58.626 | 0.000 |
| 生理盐水组  | 8    | 3.82 ± 0.24   |        |       |
| 羟乙基淀粉组 | 8    | 2.80 ± 0.32   |        |       |

**表 5** 不同处理组大鼠脑组织含水量和伊文蓝质量浓度的比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 样本例数 | 脑组织含水量(%)    | 伊文蓝( $\mu$ g/ml) |
|--------|------|--------------|------------------|
| 对照组    | 4    | 77.21 ± 1.43 | 3.51 ± 0.17      |
| 单纯缺血组  | 4    | 80.35 ± 1.86 | 4.11 ± 0.35      |
| 生理盐水组  | 4    | 83.25 ± 1.86 | 4.37 ± 0.22      |
| 羟乙基淀粉组 | 4    | 77.33 ± 1.62 | 3.83 ± 0.15      |
| F 值    |      | 71.243       | 12.528           |
| P 值    |      | 0.000        | 0.000            |

血-脑屏障通透性。

## 讨 论

脑缺血-再灌注损伤系指脑组织缺血一定时间后恢复血液灌注, 造成脑组织损伤进行性加重。心肺功能衰竭或呼吸、心搏停止均可引起脑组织缺血、缺氧, 而心肺复苏后又可诱发脑缺血-再灌注损伤, 从而导致一系列并发症。血-脑屏障是位于脑组织和血液之间的一个复杂的细胞系统, 在生理状态下, 血-脑屏障可严格控制水溶性物质和小分子电解质进入脑组织, 在导致血-脑屏障结构完整性或功能性损伤或通透性增加的因素中, 以基底膜损伤最为重要<sup>[2]</sup>。脑缺血损伤所涉及的病理生理学机制十分复杂。其中, 炎症反应和血-脑屏障破坏均是缺血性脑损伤的重要病理生理学机制<sup>[3-5]</sup>, 缺血可以引起脑组织炎症反应, 血管内白细胞聚集并穿过血管壁、浸润脑组织, 同时伴微血管功能紊乱、局部脑组织

液体和血浆蛋白质积聚,其组织学特征为白细胞浸润<sup>[6,7]</sup>。研究表明,肿瘤坏死因子- $\alpha$ 在脑缺血诱导的炎症反应中起重要作用<sup>[8]</sup>;而人造血浆代用品羟乙基淀粉减轻脑缺血-再灌注损伤的作用,可能与其分子堵塞扩大的血管内皮细胞间连接而减轻毛细血管漏有关。近年研究显示,羟乙基淀粉的这种脑保护作用可能更多与其减轻炎症损伤有关<sup>[9]</sup>。

缺血性脑血管病的实验动物模型是研究脑缺血-再灌注损伤和脑保护必不可少的工具。大鼠的大脑动脉环与人类十分相似,故常被选作脑缺血-再灌注损伤模型。传统的全脑缺血-再灌注损伤动物模型,主要参考Kameyama等<sup>[10]</sup>的四血管阻断法,即采用电灼伤阻断双侧椎动脉及夹闭双侧颈总动脉的方法复制全脑缺血-再灌注损伤模型;或参考Longa等<sup>[11]</sup>的两血管阻断法,即颈外动脉线栓法阻断进入脑的血流,建立大脑中动脉闭塞模型。但是,以上两种实验方法均不能达到完全性全脑缺血,因尚有来自脊髓后动脉的侧支动脉进入大脑。我们参考田鹤邨等<sup>[12]</sup>的实验方法,在上述两种方法的基础上改进为三血管阻断法,即于直视下进行手术,以特制的动脉夹夹闭基底动脉而非电灼伤阻断,从而减少了基底动脉损伤,为确保再灌注效果奠定了良好的基础。本实验方法不仅可以阻断脑的供血主干血管,而且闭塞了脊髓后动脉的侧支血管,所形成的脑缺血-再灌注效果确切、迅速,且稳定性良好。由于阻断部位在第二无血管区,远离供应延髓等重要生命中枢的动脉侧支,从而保证了动物模型制备过程中大鼠呼吸、循环功能的稳定,死亡率较低。在制备脑缺血-再灌注损伤模型的过程中,应用大鼠脑血流图监测脑血流变化,凡大脑中动脉阻断1 min内脑血流图未呈直线变化者均被剔除,更为有效地保证了模型的成功率。

核因子- $\kappa$ B为可与免疫球蛋白 $\kappa$ 轻链基因增强子 $\kappa$ B序列特异性结合的蛋白质转录因子,当细胞受到炎症介质、病毒感染、氧化应激等多种刺激时,可激活核因子- $\kappa$ B而启动相关基因的转录,参与机体的器官发育、免疫反应、炎症反应、氧化应激反应、细胞凋亡、肿瘤发生等重要病理生理学过程<sup>[13,14]</sup>,并发挥重要作用。核因子- $\kappa$ Bp65/p50异源二聚体是核因子- $\kappa$ B发挥主要功能的典型代表,亦是其所有形式中最重要的一种<sup>[15,16]</sup>。脑缺血-再灌注损伤时,机体可产生一系列的内源性损伤因子,进而活化核因子- $\kappa$ B,促使急性期反应蛋白、细胞间黏附分子

(ICAM)或促炎性因子等表达,导致血-脑屏障破坏,继而引起脑水肿和脑梗死。在本研究中,我们采用免疫组织化学染色方法检测不同处理组大鼠脑组织核因子- $\kappa$ B表达变化,发现人造血浆代用品6%羟乙基淀粉130/0.4具有抑制核因子- $\kappa$ B表达之作用。

脑缺血-再灌注可通过两条途径引起肿瘤坏死因子- $\alpha$ 高表达,即过氧化氢激活p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和氧化应激激活核因子- $\kappa$ B。肿瘤坏死因子- $\alpha$ 可介导IL-1、-8、-6和单核细胞趋化蛋白(MCP)等的生成,从而使免疫细胞、血管内皮细胞及纤维母细胞参与炎症反应和组织损伤;肿瘤坏死因子- $\alpha$ 高表达能够影响血-脑屏障的发育及其生理功能<sup>[17]</sup>。本研究酶联免疫吸附试验检测结果显示,单纯缺血组和羟乙基淀粉组大鼠脑组织匀浆肿瘤坏死因子- $\alpha$ 表达水平于再灌注后12 h升高,且前者显著高于后者,表明6%羟乙基淀粉130/0.4具有抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$ 活性之功效。

血-脑屏障完整性在脑缺血-再灌注损伤的病理生理学过程中至关重要,脑缺血后血液再灌注可因血-脑屏障破坏而诱发脑水肿。根据Uyama等<sup>[18]</sup>的实验原理,伊文蓝为大分子染色剂,正常情况下经静脉血管循环的伊文蓝是不能透过血-脑屏障进入脑组织的,但当血-脑屏障受损时,部分伊文蓝即可通过血管内皮等结构渗入脑组织,因此,通过测定渗出血管外的伊文蓝质量浓度可以评价动物血-脑屏障通透性的变化。我们经鼠尾静脉注射伊文蓝,通过其渗出血管外的质量浓度而评价血-脑屏障通透性。结果显示,与单纯缺血组和生理盐水组相比,羟乙基淀粉组大鼠缺血-再灌注时脑组织伊文蓝质量浓度最低( $P < 0.05$ ),提示6%羟乙基淀粉130/0.4具有降低血-脑屏障通透性的作用。脑水肿能够诱发一系列神经功能障碍,而缺血性脑水肿又分为细胞毒性脑水肿和血管源性脑水肿,缺血早期水的蓄积被认为是细胞毒性脑水肿;以后,随着蛋白质渗出微血管引起液体蓄积即产生血管源性脑水肿,是由于血-脑屏障受损、通透性增加所致。本研究结果表明,羟乙基淀粉能够降低缺血-再灌注时大鼠脑组织含水量,进一步说明降低血-脑屏障通透性对缺血后脑水肿的防治具有重要意义。

总之,本研究结果显示,脑缺血-再灌注损伤导致的核因子- $\kappa$ B活化,可破坏血-脑屏障,诱发脑水肿和脑梗死。因此,抑制核因子- $\kappa$ B转导通路激活,有望成为治疗脑缺血-再灌注损伤的重要途径。脑

缺血-再灌注损伤后给予人造血浆代用品 6% 羟乙基淀粉 130/0.4 治疗, 可改善血-脑屏障结构完整性, 降低其通透性, 减轻脑水肿, 具有一定脑保护作用; 其作用机制可能与抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$  和核因子- $\kappa$ B 表达、减轻炎性反应有关。

#### 参 考 文 献

- [1] Ickx BE, Bepperling F, Melot C, et al. Plasma substitution effects of a new hydroxyethyl starch HES 130/0.4 compared with HES 200/0.5 during and after extended acute normovolaemic haemodilution. *Br J Anesth*, 2003, 91:196-202.
- [2] Humann GF, Okata Y, Fritridge R, et al. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*, 1995, 26:2120-2126.
- [3] Zheng W. Neurotoxicology of the brain barrier system: new implications. *J Toxicol Clin Toxicol*, 2001, 39:711-719.
- [4] Cucullo L, McAllister MS, Kight K, et al. A new dynamic in vitro model for the multidimensional study of astrocyte-endothelial cell interactions at the blood-brain barrier. *Brain Res*, 2002, 951:243-254.
- [5] Marchi N, Fazio V, Cucullo L, et al. Serum transthyretin monomer as a possible of blood-to-CSF barrier disruption. *J Neumci*, 2003, 23:1949-1955.
- [6] Kelly MA, Shuaib A, Todd KG. Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Exp Neurol*, 2006, 200:38-49.
- [7] 欧阳昌汉, 吴基良, 贺震华, 等. 罗格列酮对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用. *中国药理学通报*, 2007, 23:110-113.
- [8] Lin HY, Huang CC, Chang KF. Lipopolysaccharide preconditioning reduces neuroinflammation against hypoxic ischemia and provides long-term outcome of neuroprotection in neonatal rat. *Pediatr Res*, 2009, 66:254-259.
- [9] Kaplan SS, Park TS, Gonzales ER, et al. Hydroxyethyl starch reduces leukocyte adherence and vascular injury in the newborn pig cerebral circulation after asphyxia. *Stroke*, 2000, 31:2218-2223.
- [10] Kameyama M, Suzuki J, Shirane R, et al. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat: three vessel occlusion model. *Stroke*, 1985, 16:489-493.
- [11] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- [12] 田鹤邨, 陈前芬, 谢群. 三血管阻断与重开放造成的大鼠全脑缺血/再灌注损伤的实验研究. *蚌埠医学院学报*, 1993, 18:113-117.
- [13] Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, et al. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *J Neurochem*, 2000, 75:683-693.
- [14] Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, et al. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NF-kappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 1999, 274:8531-8538.
- [15] Schmitz ML, Bacher S, Kracht M. I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26:186-190.
- [16] Driessler F, Venstrom K, Sabat R, et al. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol*, 2004, 135:64-73.
- [17] Li C, Browder W, Kao RL. Early activation of transcription factor NF-kappaB during ischemia in perfused rat heart. *Am J Physiol*, 1999, 276(Pt 2):543-552.
- [18] Uyama O, Okamura N, Yanse M, et al. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1988, 8:282-284.

(收稿日期: 2010-07-03)

## 第十四届世界临床疼痛大会、第一届亚洲疼痛大会暨 第四届中国临床疼痛学术会议征文通知

由世界疼痛医师协会、世界疼痛医师协会中国分会、中华医学会麻醉学分会、中国医师协会麻醉学医师分会和中国医师协会康复医师分会共同主办的第十四届世界临床疼痛大会、第一届亚洲疼痛大会暨第四届全国临床疼痛学术会议拟定 2010 年 10 月 29 日-11 月 1 日在北京国家会议中心隆重召开。诚挚邀请您参加此次会议! 会议面向神经外科、疼痛科、麻醉科等多个学科的国内外临床医师, 同时设立神经外科镇痛、微创介入镇痛、手术后疼痛管理等多个专业论坛。

1. 征文内容 疼痛基础与临床研究; 疼痛微创介入治疗; 急性疼痛及手术后镇痛; 其他与疼痛相关的基础与临床研究。

2. 征文要求 专题报告或综述的全文及中英文摘要(正文字数 3000 字, 中文摘要字数 1500 字), 请于文题下注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮政编码、联系方式及 Email 地址。稿件请自行分类, 并标注于摘要首页右上角, 以便于审稿、编辑和组织交流。仅接受电子版投稿, 请 Email 发送至: [wspc@mediwelcome.com](mailto:wspc@mediwelcome.com)。

3. 截稿日期 2010 年 9 月 30 日。

4. 联系方式 北京市朝阳区小营路 25 号房地置业大厦 606 室第十四届世界临床疼痛大会、第一届亚洲疼痛大会暨第四届全国临床疼痛学术会议组委会。邮政编码: 100101。联系人: 董抒羽, 王晶。联系电话: (010) 59046396。传真: (010) 59046368。Email: [wspc@mediwelcome.com](mailto:wspc@mediwelcome.com)。神经外科投稿联系方式: 北京市清华大学玉泉医院神经外科二病区王林。邮政编码: 100049。Email: [wanglin70321@126.com](mailto:wanglin70321@126.com)。详情请登录大会网址: [www.ccwspc.org](http://www.ccwspc.org), 可直接于网站上注册。