

# 高张盐水在局灶性脑缺血再灌注损伤中的作用及其机制

何荣芝 黄焕森 田文志 常业恬

**【摘要】 目的** 研究高张盐水对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后脑含水量、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )含量以及脑细胞凋亡的影响,探讨高张盐水在脑缺血再灌注损伤中的作用和机制。**方法** 健康 SD 雄性大鼠 96 只按随机数字表法分为 4 组,即假手术组(P 组)、单纯缺血再灌注组(IR 组)、7.5%高张盐水组(HS-A 组)、4.2%高张盐水组(HS-B 组),每组各 24 只。采用线栓法制作大鼠中动脉缺血模型,再灌注前经股静脉分别给予 7.5% NaCl(HS-A 组)或 4.2% NaCl(HS-B 组),P 组和 IR 组不给任何药。检查再灌注前,再灌注后 30 min、60 min、90 min 时的血清 Na<sup>+</sup> 浓度。再灌注 22 h 后,对大鼠进行神经功能缺陷评分,然后断头取脑检测左右两侧脑含水量;取缺血侧前脑皮质测 TNF- $\alpha$  含量;取梗死灶周围脑组织,用 TUNEL 法检测神经元凋亡情况。**结果** 输入高张盐水后,HS-A 组和 HS-B 组大鼠血清 Na<sup>+</sup> 浓度明显升高,HS-A 组持续到再灌注后 90 min,HS-B 组在再灌注 60 min 后基本恢复正常。IR 组大鼠两侧脑含水量较假手术组增加,缺血侧增加更明显,比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。HS-A 组和 HS-B 组大鼠两侧脑含水量较 IR 组相比明显减少,并以缺血侧减少更明显,比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );同 IR 组相比,HS-A 组和 HS-B 组大鼠脑组织 TNF- $\alpha$  含量明显降低,凋亡细胞计数明显下降,神经缺陷评分也明显下降,比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 高张盐水可减少缺血再灌注后脑含水量和脑组织 TNF- $\alpha$  含量,减轻脑细胞凋亡,改善缺血再灌注损伤后神经功能。

**【关键词】** 缺血再灌注; 高张盐水; 含水量; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 细胞凋亡

**【中图分类号】** R743.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)06-0560-03

**Effects of hypertonic saline against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and the mechanism** HE Rong-zhi\*, HUANG Huan-sen\*, TIAN Wen-zhi\*, CHANG Ye-tian. \*Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of hypertonic saline on cerebral water content, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) level and neuronal apoptosis following focal cerebral ischemia-reperfusion (IR) injury in rats and explore the mechanisms involved. **Methods** Ninety-six rats were randomized equally into 4 groups, namely the sham-operated group, untreated IR injury group, and 4.2% and 7.5% hypertonic saline groups (HS-A and HS-B groups, respectively). In the latter 3 groups, cerebral ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion for 2 h followed by administration of the corresponding treatments. Serum sodium concentration was measured at 5 min before and at 30, 60 and 90 min after the reperfusion. At 22 h of reperfusion, the rats were sacrificed after neurological deficit evaluation, and brain edema was assessed by measuring the wet-to-dry weight ratio of the brain tissue. TNF- $\alpha$  expression in the ischemic brain tissue was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the neuronal apoptosis was analyzed using TUNEL assay. **Results** In the saline-treated rats, serum sodium level increased significantly after saline administration, lasting for 60 min before recovering the normal levels in HS-A group and for over 90 min in HS-B group. Compared with that in the sham-operated group, the brain water content in rats of the IR group increased in both of the hemispheres, but more obviously in the ischemic hemisphere. In the two saline-treated groups, the water content decreased significantly in the bilateral hemispheres, which was especially obvious in the ischemic hemisphere; administration of 7.5% saline resulted in greater water content reduction in the

ischemic hemisphere than 4.2% saline. Compared with the IR group, the two saline-treated groups showed significant reduction in TNF- $\alpha$  levels and apoptotic cells in the brain along with decreased neurological deficits. **Conclusion** Hypertonic saline can ameliorate cerebral focal IR injury by decreasing the cerebral water content, TNF- $\alpha$  level and neuronal apoptosis following the injury.

**【Key words】** Ischemia-reperfusion; Hypertonic saline; Water content; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Apoptosis

脑缺血再灌注后中性粒细胞被激活,释放各种炎性细胞因子<sup>[1]</sup>,直接或间接作用于神经元和神经胶质细胞,引起脑细胞肿胀和变性,并破坏血脑屏障,使血管通透性增高,最终加重脑水肿和脑损伤。高张盐水可减少休克患者炎症介质的释放,理论上也可以减轻缺血再灌注后炎症介质对脑的损伤<sup>[2]</sup>。本研究利用线栓法制作局部脑缺血再灌注损伤模型,观察高张盐水对大鼠缺血再灌注损伤后脑含水量、脑组织肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量和脑细胞凋亡的影响,探讨高张盐水的脑保护作用 and 机制。

## 材料与方 法

### 一、实验分组

健康 SD 雄性大鼠 96 只,体质量 250~300 g,购自广州医学院动物实验中心。按随机数字表法分为 4 组,即假手术组(P 组)、单纯缺血再灌注组(IR 组)、7.5%高张盐水组(HS-A 组)、4.2%高张盐水组(HS-B 组),每组各 24 只,其中 8 只用于脑含水量测定,8 只用于脑组织 TNF- $\alpha$  含量检测,8 只用于脑细胞凋亡计数。

### 二、动物模型制作及各组处理

采用线栓法制作局部脑缺血再灌注损伤模型,大鼠麻醉后经颈总动脉向颈内动脉插入栓线,放置到大脑前动脉起始部,阻断大脑中动脉。P 组只把栓线插入到颈内动脉 5 mm,不阻断大脑中动脉的血流。缺血 2 h 后,经股静脉注射 4 mL/kg 的 7.5% NaCl(HS-A 组)或 4.2% NaCl(HS-B 组),注射时间 5 min,P 组和 IR 组不给任何药物。给完药后,把栓线退出到颈内动脉起始部,恢复大脑中动脉血流。经股静脉抽血检查再灌注前,再灌注后 30 min、60 min、90 min 时的血清 Na<sup>+</sup> 浓度。再灌注 22 h 后对大鼠进行神经功能缺陷评分。根据 Zea longa 法神经功能缺陷评分<sup>[3]</sup>:0 分为无神经损伤症状,1 分为不能完全伸展闭塞对侧前肢,2 分为向闭塞对侧转圈,3 分为向闭塞对侧倾倒,4 分为不能自发行走、意识丧失。因为 P 组没有缺血再灌注,未进行神经功能缺陷评分。

### 三、大鼠脑含水量测定

8 只大鼠直接断头取脑,分离出左右大脑半球,用滤纸吸干,分别称湿重,然后放入 100 °C 干燥箱中 24 h,再称左右大脑半球干重,脑的含水量以百分比表示,含水量=(1-干重/湿重)×100%。

### 四、脑组织 TNF- $\alpha$ 含量测定

8 只大鼠取缺血侧前脑皮质,制成匀浆,离心后取上清液 100  $\mu$ L,按 ELISA 试剂盒说明书方法测定脑组织中 TNF- $\alpha$ ,结果以每毫克蛋白所含细胞因子量(pg)来表示,即 pg/mg pro。

### 五、神经元凋亡细胞计数

8 只大鼠深麻醉,打开胸腔,经心尖部灌注 4 g/L 多聚甲醛,常规乙醇梯度脱水,自额叶至枕叶分为 A、B、C、D、E 5 等份,取 C 脑片石蜡包埋,TUNEL 法原位检测细胞凋亡。凋亡细胞计数时,每张切片在镜下( $\times 200$ )随机采集 5 个视野,采用 HPIAS-1000 图像分析系统摄入计算机,直接计数每个视野中的凋亡细胞个数,取均值作为凋亡细胞数。

### 六、统计学处理

用 SPSS 13.0 统计软件处理;计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,各组 Na<sup>+</sup> 浓度比较采用重复测量的方差分析,各组脑组织含水量、TNF- $\alpha$  含量、凋亡细胞计数及神经功能缺陷评分比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Dunnett-*t* 检验, $P\leq 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、各组大鼠 Na<sup>+</sup> 浓度比较

HS-A 组和 HS-B 组大鼠 Na<sup>+</sup> 浓度在再灌注后明显升高,HS-A 组一直持续到再灌注后 90 min,HS-B 组在再灌注 60 min 后则基本恢复正常。(表 1)

### 二、各组大鼠脑组织含水量比较

IR 组大鼠双侧脑含水量较假手术组增加,缺血侧增加更加明显,比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );HS-A 组和 HS-B 组双侧脑含水量与 IR 组相比明显减少,并以缺血侧减少更明显,比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );HS-A 组健侧和 HS-B 组健侧相比,脑含水量明显减少,比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。(表 2)

表 1 各组大鼠血清 Na<sup>+</sup> 浓度比较( $\bar{x}\pm s$ , mmol/L)

Tab.1 Comparison of serum concentration among the groups (*Mean* $\pm$ *SD*, mmol/L)

组别	例数	再灌注前	再灌注后 30 min	再灌注后 60 min	再灌注后 90 min	F 值	P 值
P 组	24	137.51 $\pm$ 0.42	137.62 $\pm$ 0.54	138.24 $\pm$ 0.32	138.52 $\pm$ 0.62	23.778	0.000
IR 组	24	138.32 $\pm$ 0.54	137.57 $\pm$ 0.61	138.73 $\pm$ 0.51	137.24 $\pm$ 0.81	28.212	0.000
HS-A 组	24	139.36 $\pm$ 0.42	148.63 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	145.56 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	144.33 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	845.930	0.000
HS-B 组	24	137.75 $\pm$ 0.42	144.31 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	141.56 $\pm$ 0.54	140.71 $\pm$ 0.73	414.520	0.000
F 值		79.287	1282.000	1159.400	472.380		
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000		

与 IR 组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05

表 2 各组大鼠双侧脑含水量比较( $\bar{x}\pm s$ , %)

Tab.2 Comparison of brain water content among the groups (*Mean* $\pm$ *SD*, %)

组别	例数	缺血侧	健侧
P 组	8	72.62 $\pm$ 1.24	71.26 $\pm$ 1.84
IR 组	8	79.83 $\pm$ 1.65 <sup>a</sup>	74.67 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>
HS-A 组	8	74.52 $\pm$ 1.12 <sup>b</sup>	71.42 $\pm$ 1.76 <sup>b</sup>
HS-B 组	8	75.23 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>	73.33 $\pm$ 1.42 <sup>bc</sup>
F 值		48.000	9.097
P 值		0.000	0.000

与 P 组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05; 与 IR 组比较, <sup>b</sup>*P*<0.05; 与 HS-A 组比较, <sup>c</sup>*P*<0.05

### 三、各组大鼠脑组织 TNF- $\alpha$ 含量和凋亡细胞计数比较

局部脑缺血再灌注损伤后大鼠脑组织 TNF- $\alpha$  含量较 P 组明显升高,高张盐水处理后大鼠脑组织 TNF- $\alpha$  含量较 IR 组明显减少,比较差异均有统计学意义(*P*<0.05)。P 组凋亡细胞计数很少,IR 组凋亡细胞计数明显上升,与 P 组相比差异有统计学意义(*P*<0.05);HS-A 组和 HS-B 组凋亡细胞计数明显下降,与 IR 组相比差异有统计学意义(*P*<0.05);HS-A 组细胞凋亡计数较 HS-B 组也有明显下降,比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。(表 3)

### 四、各组神经功能缺陷评分比较

同 IR 组比较,HS-A 组和 HS-B 组神经功能缺

表 3 各组大鼠脑组织 TNF- $\alpha$  含量和凋亡细胞计数比较( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.3 Comparison of cerebral tumor necrosis factor- $\alpha$  level and apoptotic cell number among the groups (*Mean* $\pm$ *SD*)

分组	例数	TNF- $\alpha$ 含量(pg/mg pro)	凋亡细胞计数(个)
P 组	8	2.39 $\pm$ 0.51	1.16 $\pm$ 0.74
IR 组	8	5.18 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	36.35 $\pm$ 7.24 <sup>a</sup>
HS-A 组	8	3.17 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>	14.73 $\pm$ 4.82 <sup>abc</sup>
HS-B 组	8	3.26 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	21.36 $\pm$ 5.44 <sup>ab</sup>
F 值		26.779	64.696
P 值		0.000	0.000

与 P 组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05; 与 IR 组比较, <sup>b</sup>*P*<0.05; 与 HS-B 组比较, <sup>c</sup>*P*<0.05

陷评分分别下降 31%和 22%,比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。(表 4)

表 4 各组大鼠再灌注 22 h 后神经功能缺陷评分( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.4 Comparison of neurological deficits among the groups (*Mean* $\pm$ *SD*)

组别	例数	神经功能缺陷评分
IR 组	24	2.04 $\pm$ 0.35
HS-A 组	24	1.41 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>
HS-B 组	24	1.58 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>
F 值		20.728
P 值		0.000

与 IR 组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05

## 讨 论

脑外伤后或脑缺血后的脑水肿可导致颅内压升高,是引起继发性脑损伤的重要因素。高张盐水通过其较高的渗透压把脑实质和脑血管内膜外的水分转移到血管内并转运到颅外,减少脑组织和血管内膜的含水量<sup>[4]</sup>。本研究结果表明,再灌注前单次注射高张盐水可以在短时间内迅速升高血清 Na<sup>+</sup> 浓度,并维持一段时间,从而使血液的晶体渗透压升高,使脑组织血管内外侧产生渗透压差,通过物理作用,减少脑组织的含水量,表现为 HS-A 组和 HS-B 组缺血侧和健侧脑半球脑含水量比 IR 组少。

另外,高张盐水对缺血侧和健侧脑组织含水量的影响是不同的。HS-A 组大鼠健侧脑组织的含水量比 HS-B 组健侧脑组织的含水量少,比较差异有统计学意义(*P*<0.05);HS-A 组缺血侧脑组织的含水量比 HS-B 组有下降的趋势,但差异无统计学意义。其机理目前尚不清楚,但临床上可利用这特点,根据健侧脑组织水肿的程度选择不同浓度的高张盐水。

TNF- $\alpha$  主要由巨噬细胞、单核细胞产生,是一种具有广泛生物学功能的细胞因子,它参与机体免疫应答和炎症反应。局灶性脑缺血再灌注可上调

(下转 566 页)

增强有关。在脑干的神经元发生坏死性改变,与脑室梗阻引起颅内高压、血流减少和血肿内红细胞裂解产生的细胞毒物等有关,可能是临床上 IVH 患者预后不良最直接的原因,更解释了第三脑室和第四脑室铸型扩张的患者为什么预后极差。同时也提示临床 IVH 患者 24 h 治疗时间窗的必要性。

Hua 等<sup>[4]</sup>使用触须诱发前肢放置实验法观察 IVH 后大鼠的神经行为变化,结果表明该法能够较敏感的反映中枢神经系统损伤后的感觉与运动功能障碍。我们利用此法在实验中发现,模型组大鼠的 Hua 法评分在注血后 6 h 和 1 d 明显降低,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );注血后 3 d、5 d、7 d 大鼠的 Hua 法评分逐渐升高,与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。这提示 IVH 后 24 h 对大鼠神经功能影响最大,可能与此期脑室梗阻、颅内高压以及脑干神经元损伤等有关。随着病程延长,血肿消散、吸收,脑脊液循环改善,颅内压降低,Hua 法评分明显增加。

本实验制备的大鼠 IVH 模型方法简单,模型成功率高,其很好地模拟了人类 IVH 的自然过程,显示出与人类 IVH 相似的病理变化,揭示了 IVH 预后的可能机制,是进行 IVH 基础与药物干预研究较理想的动物模型。

志谢 本实验得到新乡医学院第二附属医院神经内科实验中心大力支持,特表感谢

参 考 文 献

- [1] Wang YC, Lin CW, Shen CC, et al. Tissue plasminogen activator for the treatment of intraventricular hematoma: The dose-effect relationship[J]. J Neurol Sci, 2002, 202(1-2): 35-41.
- [2] Hanley DF, Naff NJ, Harris DM. Intraventricular hemorrhage: presentation and management options[J]. Semin Cerebrovasc Dis Stroke, 2005, 5(3): 209-216.
- [3] Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates [M]. San Diego: Academic Press, 1997: 20-36.
- [4] Hua Y, Schallert T, Keep RF, et al. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat[J]. Stroke, 2002, 33(10): 2478-2484.
- [5] Pang D, Scwabassi RJ, Horton JA. Lysis of intraventricular blood clot with urokinase in a canine model: Part 1. Canine intraventricular blood cast model[J]. Neurosurgery, 1986, 19(4): 540-546.
- [6] Narayan RK, Narayan TM, Katz DA, et al. Lysis of intracranial hematomas with urokinase in a rabbit model[J]. Neurosurg, 1985, 62(4): 580-586.
- [7] Mayfrank L, Kim Y, Kissler J, et al. Morphological changes following experimental intraventricular haemorrhage and intraventricular fibrinolytic treatment with recombinant tissue plasminogen activator[J]. Acta Neuropathol, 2000, 100(5):561-567.
- [8] Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage [J]. Lancet Neurol, 2006, 5(1): 53-63.

(收稿日期:2009-02-13)

(本文编辑:刘凯)



(上接 562 页)

TNF- $\alpha$  的表达,TNF- $\alpha$  与受体结合后,活化一系列信使因子,增加细胞因子的表达,促进炎症反应的升级<sup>[5]</sup>。本研究结果表明,高张盐水可减少缺血再灌注后脑组织 TNF- $\alpha$  的含量,7.5% NaCl 和 4.2% NaCl 效果都非常好。其机理可能是高张盐水能诱导中性粒细胞的酪氨酸磷酸化,降低  $\beta 2$ -介素表达,减少弹性酶的释放和超氧阴离子的产生。高张盐水还可减少脑缺血再灌注损伤后细胞的凋亡,7.5% NaCl 和 4.2% NaCl 都有效,但 7.5% NaCl 效果更明显。高张盐水减轻脑细胞凋亡的机理可能与减少脑组织 TNF- $\alpha$  的释放有关。因为在脑缺血再灌注后 TNF- $\alpha$  与细胞膜上的死亡受体结合,通过一系列瀑布反应,最终激活 caspase-3,后者为死亡信号的最终执行者,使细胞向凋亡方向发展<sup>[6]</sup>。由于高张盐水减轻了脑组织的水肿及脑细胞的凋亡,神经元的受损也大为减轻,表现为 HS-A 组和 HS-B 组大鼠神经功能缺陷评分比 IR 组降低。

参 考 文 献

- [1] Vila N, Castillo J, Davalos A, et al. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke[J]. Stroke, 2000, 31(1): 23-25.
- [2] Coimbra R, Loomis W, Melbostad H, et al. Role of hypertonic saline and pentoxifylline on neutrophil activation and tumor necrosis factor-alpha synthesis: a novel resuscitation strategy[J]. J Trauma, 2005, 59(2): 257-264.
- [3] Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-97.
- [4] Qureshi AI, Suarez JI. Use of hypertonic saline solutions in treatment of cerebral edema and intracranial hypertension[J]. Crit Care Med, 2000, 28: 3301-3313
- [5] Heller RA, Konkre M. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways[J]. J Cell Biol, 1994, 126(1): 5-9.
- [6] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407(6805): 770-776.

(收稿日期:2008-12-23)

(本文编辑:刘凯)