

不同氧浓度复苏对创伤性轴索损伤合并低氧血症后大鼠脑组织的影响

温明哲 王 杨 朱坤灿 庄步峰 吴芳芳 王洪财 段志新 马延斌

摘 要 **目的** 在创伤性轴索损伤 (traumatic axonal injury, TAI) 合并低氧血症性二次脑损伤 (secondary brain injury, SBI) 大鼠模型基础上进一步探讨不同氧浓度复苏对大鼠脑组织病理学的影响。**方法** 应用自制 TAI 致伤装置, 大鼠伤后给予 10% 浓度氧吸入 30min 制成低氧血症性 SBI 模型, 随后给予大鼠不同氧浓度混合气体 1h, 复苏后不同时间点 (24h、1 周) 进行免疫组化染色。**结果** 脑干 ROI 的 β -APP 免疫组化染色显示, 24h 时 TAI 合并缺氧组的阳性染色明显强于各复苏组, 50% 氧浓度时的阳性染色最弱; 各组阳性染色随时间而减弱, 1 周时各组阳性染色明显弱于 24h, 此时 TAI 合并缺氧组的阳性染色仍明显强于各复苏组, 50% 氧浓度时的阳性染色最弱。染色阳性的神经轴索半定量分析显示, 24h 时 TAI 合并缺氧组明显高于各复苏组, 50% 氧浓度时的值最低; 各组数值随时间而降低, 1 周时各组值明显低于 24h, 此时 TAI 合并缺氧组的值仍高于各复苏组, 50% 氧浓度的值仍为最低。**结论** 给氧治疗可以显著减低轴索损伤, 起到神经保护作用; 对于当前的 TAI 合并缺氧动物模型的最佳复苏氧浓度为 50%。

关键词 创伤性轴索损伤 二次脑损伤 低氧血症 β -淀粉样前体蛋白

[中图分类号] R651.1 [文献标识码] A

Effect of Different Oxygen Concentration on the Brain Tissue of Post-Traumatic Axonal Injury with Hypoxia. Wen Mingzhe, Wang Yang, Zhu Kuncan, et al. Department of Neurosurgery, NO. 3 People's Hospital Affiliated To Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

Abstract Objective To explore the effects of different oxygen concentrations on the brain tissue in the hypoxia-induced secondary brain injury (SBI) rat subjected to traumatic axonal injury (TAI). **Methods** TAI and systemic hypoxia was induced by an impact-acceleration & rotation device and ventilating rats with 10% oxygen in nitrogen 30min, respectively. After that the rats were given different concentrations of oxygen gas mixture 1 hour. Immunohistochemistry staining among those groups were systemically assessed and compared. **Results** Beta-APP immune staining in brainstem ROI showed that when 24h positive staining of TAI and hypoxia group was stronger than the resuscitation groups. When 50% oxygen concentration the positive staining was the weakest. The positive staining decreased over time. and 1w positive staining was weaker than that in 24h. The positive staining of TAI combined with hypoxia group was obvious stronger than the recovery groups, and the positive staining in 50% oxygen concentration was the weakest. Positive staining of axonal semi quantitative analysis showed that, it was significantly higher in 24h TAI combined with hypoxia group than that of the resuscitation groups, with minimum value of 50% oxygen concentration. Numerical groups decreased with time, and 1w value of each group was significantly lower than that in 24h. Values in the TAI combined hypoxia group were still higher than the resuscitation groups, and 50% oxygen concentration values still was the lowest. **Conclusion** Oxygen therapy can significantly reduce axonal injury, thus play a neuroprotective role. For the best recovery to TAI combined with hypoxia in the current animal model, the oxygen concentration is about 50%.

Key words Traumatic axonal injury; Secondary brain insult; Hypoxemia; Beta-amyloid precursor protein

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是 45 岁以下人群死亡和致残的首要原因, 在工业化国家每

年占有所有与创伤有关的死亡人数的 25%。TBI 患者的预后与损伤的类型、原发性损伤的严重程度以及二次损伤的发生 (脑缺血缺氧、脑低灌注压等) 有关, 临床资料表明这些 SBI 因素可以明显增加患者的病死率和致残率^[1,2]。脑对缺血、缺氧极其敏感, 目前普遍采用吸氧的方式来预防和治疗脑组织缺氧。目前在缺氧患者的复苏过程中常使用纯氧或高浓度氧, 对不同浓度复苏并无相关研究。本实验在 SBI 模型上

基金项目: 上海交通大学医学院科技基金资助项目 (12XJ10029)

作者单位: 201900 上海交通大学医学院附属第三人民医院 (温明哲、王杨、朱坤灿、庄步峰、吴芳芳、段志新、马延斌); 315040 宁波市医疗中心李惠利医院神经外科 (王洪财)

通讯作者: 马延斌, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 电子信箱: my-bxj1026@aliyun.com

研究不同复苏氧浓度对 TBI 后大鼠脑组织病理学的影响,为临床 TBI 患者伤后的通气复苏提供理论依据。

材料与方法

1. 动物分组:健康成年雄性 SD 大鼠 48 只,体重 300 ~ 350g,随机分为 21% O₂ 复苏组、50% O₂ 复苏组、75% O₂ 复苏组、100% O₂ 复苏组、假手术组(Sham)、打击合并缺氧组(TAI + H),每组各 8 只大鼠。

2. 动物模型的建立:大鼠经 0.2ml/100g 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,TAI 模型的制作参照笔者之前自行研制的联合致伤装置^[3]。切开头皮用牙科胶将钢垫固定于大鼠颅骨穹隆部,预先扭转驱动弹簧 90° 使固定部分处于水平位置并由限位销限位,后将大鼠置于海绵垫上固定。待动物静止稳定后,450g 砝码从 90cm 高处沿有机玻璃管坠落于钢垫上,砝码继续下降 1cm 后与其相连的刚性连接绳拉动触发按钮,引起触发弹簧驱动限位销移位,固定部分遂发生顺时针 90° 旋转,后撞击于限位固定块瞬间停止,产生旋转加减速损伤。大鼠头部打击后,气管插管,Harvard Apparatus 683 呼吸机辅助呼吸,给予 10% 氧气通气 30min 完成 SBI 模型的制作。之后各复苏组给予相应的不同氧浓度的气体进行复苏,打击合并缺氧组(TAI + H)头部后给予 10% 氧气通气 30min;假手术组给予头皮及颈部皮肤切开后缝合,不予其他特殊处理。

3. 免疫组织化学检测:伤后不同时间点(24h、1 周)行腹腔深度麻醉致死,经 40g/L 多聚甲醛灌注固定,随后行免疫组织化学染色。

4. 免疫组织化学图像分析:取某一脑干感兴趣区(region of interest, ROI)代表性层面的 3 张连续切片,ROI 区内任选 3 个高倍视野(200 倍)摄片,采取用 Image - Pro Plus(IPP) 6.0 分析测量软件,将 β - APP 免疫染色图像灰度单位转换成光密度单位,用光密度法测量累积光密度(integrated optical density, IOD)的平均值。

5. 统计学方法:所有数据使用 SAS 9.0 软件进行数据分析,计量数据均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两均数间比较采用 *t* 检验,多组数据比较采用方差分析,均数间的多重比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

在大鼠脑干的 ROI,伤后 24h 时 TAI + H 组的 β - APP 染色的 IOD 值明显高于 4 个复苏组($P < 0.01$)。当氧浓度为 50% 时,免疫组化染色的 IOD 值最低,与其他各组有统计学差异($P < 0.05$),且随着氧浓度的升高其 IOD 值也随之升高,同时氧浓度为 21% 时其 IOD 值与 75% 时无统计学差异($P > 0.05$),但与其他各组比较有统计学差异($P < 0.05$);75% 氧浓度与 100% 时,其 IOD 值也具有统计学差异($P < 0.05$)。伤后 1 周时,各组的 IOD 值均比 24h 时明显降低($P < 0.01$);各复苏组的 IOD 值显著低于 TAI +

H 组($P < 0.01$);氧浓度为 50% 时,其 IOD 值最低,与其他各组相比有统计学差异($P < 0.05$),且随着氧浓度的升高其 IOD 值也随之升高;同时氧浓度为 21% 时其 IOD 值与 75% 时无统计学差异($P > 0.05$),但与其他各组比较有统计学差异($P < 0.05$);75% 氧浓度与 100% 时,其 IOD 值也具有统计学差异($P < 0.05$)随氧浓度升高而上升;氧浓度为 21% 时其 IOD 值与 75% 时无明显差异($P > 0.05$)。神经轴索阳性染色及 IOD 值,见图 1、图 2。

讨 论

TBI 的预后不仅与原发性损伤有关,更重要的是伴随发生的二次损伤,如缺氧。研究显示,1/4 到 1/3 的重型脑外伤患者合并有严重的脑缺氧^[4]。而另一项研究发现,高达 44% 的重型 TBI 患者合并脑缺氧^[5]。TBI 合并缺氧可以显著降低动脉血氧分压、动脉血氧饱和度,增加损伤灶面积,加重脑组织水肿,促进海马区神经元死亡,加剧感觉运动、行为及认知功能障碍^[6-10]。因此及时纠正缺氧对 TBI 患者十分重要。大量研究证明,高浓度氧可以显著提高 PaO₂ 及脑组织氧分压(partial pressure of brain tissue O₂, PbtO₂),而 PbtO₂ 是脑组织氧气供应和消耗平衡的良好指标^[11,12]。笔者之前的研究也证实高浓度氧可以显著提高 PaO₂ 和血氧饱和度^[13]。大量研究表明,通气复苏可以通过提高 PaO₂ 和 PbtO₂ 来增加到达线粒体的氧气量,改善线粒体的功能,从而改善脑组织能量代谢,同时可以明显减轻创伤后颅内压的升高、脑水肿,减少神经元的变性和坏死,并且可以降低病死率和改善预后,具有神经功能保护作用^[12]。

笔者采用光密度法定量评估脑干内 β - APP 的表达量,该方法较传统的人工计数神经轴索染色数更为客观,且具可重复性。IOD 值越高,说明 β - APP 的表达量越高,轴索损伤的程度越严重。笔者研究发现,通气复苏可以显著降低脑干 ROI 的 IOD 值。在 24h 时,TAI + H 组可见明显的神经元染色阳性以及轴索染色阳性,而通气复苏各组的阳性染色显著少于 TAI + H 组,50% 氧浓度时其 IOD 值最低。在 1 周时,各组阳性染色均较 24h 时明显下降,但是 TAI + H 组还是高于各复苏组,50% 氧浓度时其 IOD 值仍为最低。结果说明,通气复苏有效改善了轴索损伤,且 50% 氧浓度时效果最佳,但其作用机制尚未明了。

可能是当氧浓度为 21% 时,此时的 SpO₂ 和 PaO₂ 已经恢复至正常值,但是此时可能由于线粒体功能障碍以及能量需求的增加,导致机体相对缺氧,线粒体

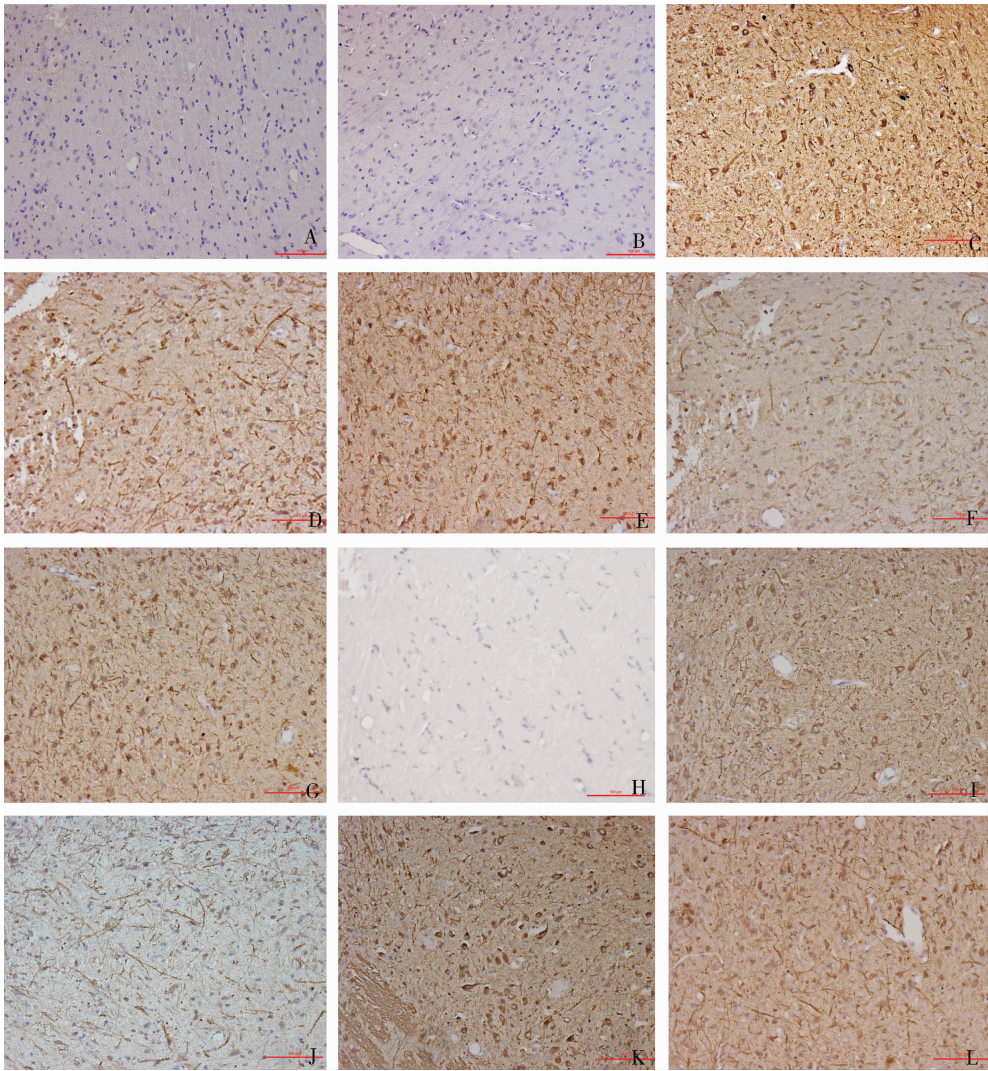


图 1 大鼠复苏后脑干 ROIβ-APP 免疫组化染色 (×200 倍)

A、B. Sham 组;C、D. 分别为 TAI + H 组伤后 24h、1 周两个亚组;E、F. 分别为 21% O₂ 复苏组伤后 24h、1 周两个亚组;G、H. 分别为 50% O₂ 复苏组伤后 24h、1 周两个亚组;I、J. 分别为 75% O₂ 复苏组伤后 24h、1 周两个亚组;K、L. 分别为 100% O₂ 复苏组伤后 24h、1 周两个亚组

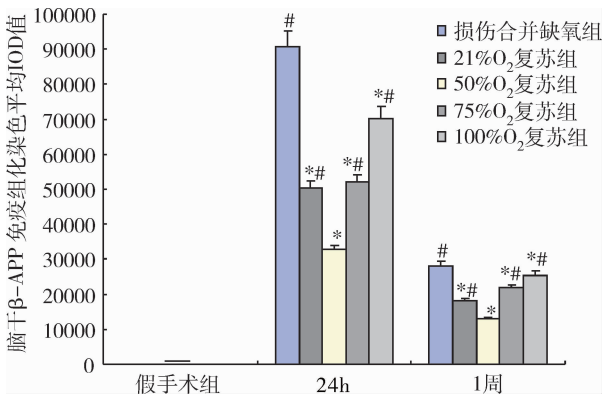


图 2 各组脑干 ROI 平均 IOD 值比较

与 TAI + H 组 IOD 值比较, * $P < 0.05$; 与 50% O₂ 复苏组比较, # $P < 0.05$

呼吸链电子传递中断,氧分子被还原为 O²⁻,细胞内能量分解增加,大量 ATP 降解为次黄嘌呤,后者在还原成尿酸过程中产生一些 O²⁻,同时可被抗氧化物质部分清除,因而 21% 氧浓度较 TAI + H 组轴索损伤好转,但是并未回复至正常水平。当氧浓度为 50% 时,SpO₂ 已接近 100%,而 PaO₂ 是正常时的 1.8 倍,此浓度时 IOD 值最低,即阳性轴索最少,说明已基本满足了机体需要,同时氧化应激较轻。1 周时 IOD 明显降低,随着时间推移急性期产生的自由基已基本清除,同时机体内在的抗氧化物质也已经恢复,此时氧化和抗氧化能力可能处于相对平衡状态。当氧浓度为 75%、100% 时,SpO₂ 已达 100%,而 PaO₂ 显著高于正

常,严重超过了机体的需求。此时,由于血液与组织细胞间的血氧分压差增大,氧的扩散加速,组织细胞因获得氧过多而产生过多的氧自由基;过多的氧自由基,且远超过机体抗氧化系统清除的能力,可以造成两方面的损伤,生物膜脂质过氧化和破坏蛋白质的多肽链。由于酶都是蛋白质,其活性会受到影响。大量实验和临床证据表明,自由基的产生及其脂质过氧化反应是引起脑神经损伤的重要因素。有研究显示 TBI 后给予高浓度氧可以产生氧化应激,引起神经元的死亡及神经功能障碍。

总之,笔者在 TAI 合并缺氧的动物模型基础上,给予不同氧浓度气体来研究对大鼠脑组织病理学的影响。发现给氧可以改善急性期轴索损伤,起到神经保护作用,而且恢复期轴索损伤明显改善,但选择合适的氧浓度至关重要。本研究认为对于 TAI 合并缺氧动物模型来说,50% 氧浓度对创伤后缺氧是最佳的复苏浓度。然而,如何根据患者病情选择合适的治疗时机、治疗方式、持续时间,这些仍需要进一步深入的研究。

参考文献

- 1 Bratton SL, Chesnut RM, Ghajar J, *et al.* Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. I. Blood pressure and oxygenation[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(Suppl):S7-13
- 2 McHugh GS, Engel DC, Butcher I, *et al.* Prognostic value of secondary insults in traumatic brain injury: results from the IMPACT study[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(2):287-293
- 3 Wang H, Duan Z, Wu F, *et al.* A new rat model for diffuse axonal injury with linear acceleration and angular acceleration combined[J]. Journal of Neurotrauma, 2010, 27(4):707-719
- 4 Manley G, Knudson MM, Morabito D, *et al.* Hypotension, hypoxia,

- and head injury: frequency, duration, and consequences[J]. Arch Surg, 2001, 136(10):1118-1123
- 5 McHugh GS, Engel DC, Butcher I, *et al.* Prognostic value of secondary insults in traumatic brain injury: results from the IMPACT study[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(2):287-293
- 6 Hellewell SC, Yan EB, Bye N, *et al.* Post-traumatic hypoxia exacerbates brain tissue damage: analysis of axonal injury and glial responses[J]. J Neurotrauma, 2010, 27(11):1997-2010
- 7 Feng JF, Zhao X, Gurkoff GG, *et al.* Post-traumatic hypoxia exacerbates neuronal cell death in the hippocampus[J]. J Neurotrauma, 2012, 29(6):1167-1179
- 8 Matsushita Y, Bramlett HM, Alonso O, *et al.* Posttraumatic hypothermia is neuroprotective in a model of traumatic brain injury complicated by a secondary hypoxic insult[J]. Crit Care Med, 2001, 29(11):2060-2066
- 9 Robertson CL, Clark RSB, Dixon CE, *et al.* No long-term benefit from hypothermia after severe traumatic brain injury with secondary insult in rats[J]. Crit Care Med, 2000, 28(9):3218-3223
- 10 Yan EB, Hellewell SC, Bellander BM, *et al.* Post-traumatic hypoxia exacerbates neurological deficit, neuroinflammation and cerebral metabolism in rats with diffuse traumatic brain injury[J]. J Neuroinflammation, 2011, 8:147
- 11 Vilalta A, Sahuquillo J, Merino MA, *et al.* Normobaric hyperoxia in traumatic brain injury: does brain metabolic state influence the response to hyperoxic challenge[J]. J Neurotrauma, 2011, 28(7):1139-1148
- 12 Rangel-Castilla L, Lara LR, Gopinath S, *et al.* Cerebral hemodynamic effects of acute hyperoxia and hyperventilation after severe traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2010, 27(10):1853-1863
- 13 温明哲, 王杨, 马延斌, 等. 不同氧浓度对创伤性轴索损伤合并低氧血症大鼠血气结果的影响[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013, 7(22):10084-10087

(收稿日期:2014-04-03)

(修回日期:2014-04-16)

超声造影在甲状腺微小癌血流灌注方面的初步研究

赵雅萍 肖莉莉 周秀萍 尹海辉 张其敏 邹春鹏 许崇永 林小瑜

摘要 目的 应用超声造影动态观察常规超声 TI-RADS 3 级及 3 级以上的甲状腺小结节的血流灌注特点,定量分析 TIC 曲线,探讨甲状腺微小癌超声造影的特征性表现。**方法** 选取在笔者医院就诊常规超声诊断为 TI-RADS 3 级及 3 级以上的、结节直径 <1cm 患者 67 例,共 72 个甲状腺结节行超声造影,所有结节均经手术切除并获得病理诊断。超声造影观察甲状腺结节增强模式和增强强度,分析良、恶性结节的超声造影增强规律。应用 Contrast Dynamic 定量分析软件分别在甲状腺结节及周边正

基金项目:温州市科技局计划项目(Y20080113)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院

通讯作者:许崇永,主任医师,电子信箱:1719882385@qq.com