

低温异丙酚对脊髓缺血再灌注损伤保护作用的实验研究*

曾 俊, 林艳君, 王泉云[△], 方 华, 姚俊岩
四川大学华西医院 麻醉科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨低温异丙酚经腹主动脉灌注对兔脊髓缺血再灌注损伤的保护作用。方法 健康成年新西兰大白兔 60 只。随机分为 6 组, 每组 10 只, 分别为 S_N 组(生理盐水组)、IP_N 组(10% 常温脂肪乳组)、P_N 组(50 mg/kg 常温异丙酚组)、S_H 组(4℃ 生理盐水组)、P_H 组(4℃ 50 mg/kg 异丙酚组)、IP_H 组(4℃ 10% 脂肪乳组)。每组的灌注容积均为 5 mL/kg, 灌注速度为 10 mL/(kg·h)。采用左肾下腹主动脉阻断法建立脊髓缺血再灌注模型, 阻断开始时即泵入灌注液, 30 min 后停止灌注并开放腹主动脉。记录术中兔生命体征及再灌注后 6 h、24 h、48 h 神经行为学评分, 于再灌注后 48 h 取 L₄₋₆ 节段脊髓观察组织形态学改变; 取 T₈ 节段脊髓组织作为正常对照(N 组), 测定 L₄₋₆ 脊髓组织中兴奋性氨基酸(EAA)及丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的含量。结果 ① 与对照组(S_N、IP_N 组)比较, 常温异丙酚组(P_N 组)和低温灌注组(S_H、P_H、IP_H 组)动物神经行为学评分均明显升高, 脊髓组织中 EAA 含量明显降低, 其中以低温异丙酚组(P_H 组)最显著($P < 0.05$), S_N、IP_N 组间差异无统计学意义。② 与正常对照组(N 组)比较, 各实验组(S_N~IP_H 组) L₄₋₆ 脊髓组织中 EAA 及 MDA 含量明显升高, 而 SOD 含量明显降低($P < 0.05$)。③ 与 S_N、IP_N、S_H、IP_H 组比较, 常温 and 低温异丙酚组(P_N、P_H 组)脊髓组织中 SOD 含量明显升高, MDA 含量降低($P < 0.05$)。但 P_N、P_H 两组间差异无统计学意义。结论 异丙酚及低温液体均能减轻脊髓缺血再灌注损伤, 具有脊髓保护作用, 其中低温异丙酚的保护作用更显著。

【关键词】 低温 异丙酚 脊髓 缺血再灌注损伤

【中图分类号】 R969

Protective Effect of Hypothermic Propofol on Ischemic Spinal Cords ZENG Jun, LIN Yan-jun, WANG Quan-yun[△], FANG Hua, YAO Jun-yan. Department of Anesthesiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】 Objective To evaluate the protective effect of hypothermic propofol infused via the aorta against ischemia/reperfusion injury of spinal cords in rabbits. **Methods** Sixty New Zealand white rabbits were randomly divided into six groups ($n=10$ in each group). The infrarenal circum-aortic clamping model was used in this study. During the 30-min clamping time, 5 mL/kg of normal saline, 10% intralipid, propofol, 4℃ saline, 4℃ intralipid and 4℃ propofol were infused into the left femoral arteries of the rabbits in group S_N, IP_N, P_N, S_H, P_H and IP_H, respectively, at a rate 10 mL/(kg·h). The heart rates, blood pressures, respiratory rates and SPO₂ were measured during the ischemia-reperfusion processes. The neurological status (Tarlov Scale system) were assessed 6h, 24 h, and 48 h after the reperfusion. The spinal cords were harvested 48h after the reperfusion for histological analysis. The concentrations of excitatory amino (EAA, aspartate and glutamate), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in the harvested spinal cords were determined. **Results** Group P_N, S_H, P_H and IP_H had better neurological outcomes and less severe pathological changes than group S_N and IP_N ($P < 0.05$). There were no significant differences between group S_N and IP_N ($P > 0.05$). Group P_N, S_H, P_H and IP_H had lower concentrations of EAA in spinal cords than group S_N and IP_N ($P < 0.05$). Group P_H had the best neurological outcome, the least histopathological changes of spinal cords, and the lowest concentrations of EAA ($P < 0.05$). Groups P_N and P_H had lower concentrations of malondialdehyde than group S_N, IP_N, S_H and IP_H. Groups P_N and P_H had higher concentrations of superoxide dismutase than group S_N, IP_N, S_H and IP_H ($P < 0.05$). **Conclusion** Both propofol and hypothermic liquids can protect spinal cords against ischemia/reperfusion injuries. Combined use of propofol and hypothermia results in significant recovery of spinal cord functions.

【Key words】 Hypothermia Propofol Spinal cord Ischemia/reperfusion injury

* 国家教育部高等学校博士学科点专项科研基金(项目编号:

B12003610087)资助

[△] Corresponding author, E-mail: wqy194119@yahoo.com.cn

脊髓缺血再灌注损伤是胸腹主动脉瘤手术的严重并发症之一。历年来,许多研究者一直致力于减少其发生率的方法,如低温治疗、远端动脉灌注、脑脊液引流等,在众多方法中,局部低温治疗因全身影

响轻微曾倍受研究者的重视,但继后的研究发现单纯的低温治疗存在降温不彻底、操作复杂以及影响脊髓血供等缺点^[1,2]。目前研究提示若低温与药物治疗相结合,对脊髓缺血再灌注损伤有确切的保护作用^[3],且动物实验也证实异丙酚对心脏及脊髓均有保护作用^[4,5]。本研究拟将局部低温及异丙酚局部灌注相结合,经腹主动脉灌注4℃异丙酚,旨在探讨低温异丙酚局部灌注对脊髓缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年新西兰大白兔60只,体质量2.0~2.5 kg,雌雄各半。随机分为6组($n=10$),即生理盐水组(S_N),10%常温脂肪乳组(IP_N),50 mg/kg 常温异丙酚组(P_N),低温(4℃)生理盐水组(S_H),50 mg/kg 低温(4℃)异丙酚组(P_H)及10%低温(4℃)脂肪乳组(IP_H)。每组灌注容积均按5 mL/kg 配制。

1.2 麻醉方法

氯胺酮20~25 mg/kg和咪唑安定0.4~0.5 mg/kg肌注后行耳缘静脉穿刺,建立静脉通道,术中持续输入乳酸林格氏液10 mL/(kg·h)。咪唑安定0.5 mg/kg静脉注射后,明视下行气管插管,定压通气。持续监测心电图、脉搏血氧饱和度、口咽及直肠温度,于左耳中央动脉穿刺监测直接动脉压。间断注射咪唑安定0.5 mg/kg、芬太尼0.01 mg/kg、维库溴铵0.25 mg/kg维持麻醉。

1.3 动物模型建立及药物灌注

麻醉成功后,将动物固定,阻断左肾下腹主动脉建立脊髓缺血模型^[6]。阻断开始时以10 mL/(kg·h)的速度经硬膜外导管分别持续泵入6种灌注液(其中3种低温灌注液均先放入冰箱降至4℃,泵入时用冰盒维持温度恒定),泵至30 min停止灌注,后缓慢开放腹主动脉及双侧髂总动脉。拔除硬膜外导管,结扎该侧股动脉,逐层关腹。待动物自主呼吸恢复正常并不能耐受气管导管时,拔除导管,若动物肛温低于36℃,放于变温毯上复温。

1.4 标本采集

于再灌注后48 h,全麻下迅速取出L₄₋₆节段的脊髓。每段均分为两份,一份用40 g/L福尔马林固定48 h,另一份立刻放入深低温冰箱(-70℃)中保存。用抽签法在每组中选取2只动物,在采集标本时同时取T₈节段脊髓组织保存于冰箱中,将其作

为兴奋性氨基酸(EAA)及丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)检测时的正常对照组(N组)。

1.5 检测指标

1.5.1 神经功能观察 分别于清醒时刻、再灌注后6 h、24 h和48 h时根据Tarlov^[5]标准对动物的神经行为学进行评分并记录。0级:无可察觉的后肢活动;1级:可察觉的微弱后肢活动,但无法对抗重力;2级:后肢能对抗重力但无法站立;3级:可站立但无法跳跃;4级:后肢功能完全恢复,能正常跳跃。

1.5.2 脊髓前角病理学观察 将用福尔马林固定的脊髓组织取出后进行石蜡包埋、切片(5 μm)及HE染色。以400倍光镜观察组织形态学改变。

1.5.3 脊髓组织兴奋性氨基酸检测 取深低温冰箱内保存的L₅节段脊髓组织,解冻后洗去表面的血迹、称重,按1:9的质量比加入4℃冰生理盐水。在冰浴下用匀浆器制备匀浆液,并用低温离心机以12 000 r/min离心15 min,取上清液移入Eppendorf管。记录脊髓组织质量和所加生理盐水量,计算出匀浆液中脊髓组织的浓度。用高效液相色谱法测定脊髓组织中谷氨酸及天门冬氨酸的含量(美国安捷伦1100高效液相色谱仪系统)。色柱条件:预柱为Kromasil C₄柱(5 cm×4.6 mm, 5 μm),分析柱为YMC C₁₈(15 cm×4.6 mm, 5 μm),预柱和分析柱流动相均为0.025 mol/L KH₂PO₄(pH7.0):乙腈(70:30),流速1.0 mL/min,切换时间:0.8~1.2 min,紫外检测波长360 nm。

1.5.4 脊髓组织MDA、SOD含量测定 取深低温冰箱保存的脊髓组织,切取约0.2 g,称重后按组织与水1:9的质量比加入冰盐水,匀浆。将匀浆液分为3部分,一部分按MDA试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书以硫代巴比妥酸法测定组织中MDA含量;一部分按SOD试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书以黄嘌呤氧化酶法测定组织中SOD含量;其余用分光光度仪以考马斯亮蓝法测定蛋白含量。按照试剂说明书换算MDA、SOD含量。

1.6 统计学方法

各组间神经行为学评分采用非参数秩和检验(Kruskal-Wallis)进行分析。兴奋性氨基酸及MDA、SOD含量用均数±标准差表示,采用单因素方差分析进行比较分析,组间差异采用两两比较的 q 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

各组心率维持基本稳定。P_N、P_H 两组在阻断 15 min 时平均动脉压均有不同程度下降, 开放后 25 min 恢复至基础值水平, 两组间比较差异无统计学意义。灌注 15 min 后, 低温灌注组(S_H、P_H、IP_H 组)动物的口咽温和肛温均有不同程度的降低, 以肛温的下降最为明显, 3 组间差异无统计学意义。

2.2 神经行为学评分

与 S_N 组及 IP_N 组相比较, P_N、S_H、P_H 及 IP_H 组各时点的神经行为学评分明显升高, 其中 P_H 组中 0 级及 1 级动物只数最少, 而 4 级只数最多, 神经行为学评分最高($P < 0.05$)。S_N 组与 IP_N 组无明显差异。见表 1。

表 1 各组各时点神经功能转归

Table 1 The neurological functional status of rabbits over time by groups

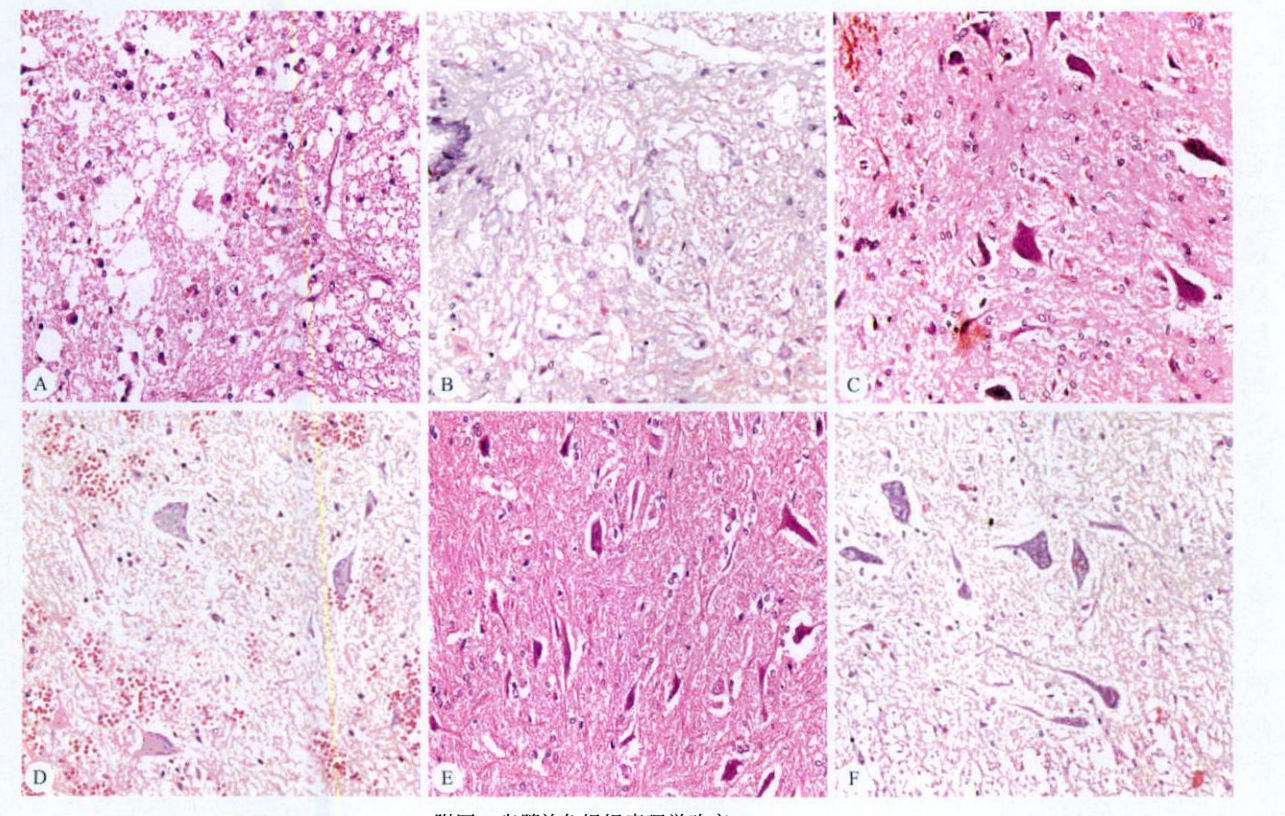
Group	n	Awake					6 h after reperfusion					24 h after reperfusion					48 h after reperfusion				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
S _N	10	8	0	0	1	1	8	0	0	1	1	7	1	0	1	1	7	1	1	0	1
IP _N	10	8	1	0	0	0	8	1	1	0	0	7	2	1	0	0	7	2	1	0	0
P _N	10	1	3	0	3	3	1	2	0	4	3	1	2	0	4	3	1	2	0	4	3
S _H	10	4	0	0	3	3	4	0	0	4	2	5	0	0	3	2	5	0	0	3	2
P _H	10	2	0	3	2	3	2	0	0	4	4	2	0	1	3	4	2	1	0	2	5
IP _H	10	3	1	0	3	2	4	0	0	3	3	4	0	0	3	3	5	0	0	2	3

2.3 脊髓前角病理学变化

结果见附图。S_N 组及 IP_N 组脊髓组织均呈广泛坏死, 正常神经元极度减少甚至缺乏, 剩余神经细胞肿胀, 核固缩, 核周间隙增大。白质可见正常髓鞘受破坏, 大量炎性细胞浸润。P_N、S_H、IP_H 组前角组

织水肿, 点、片状出血, 部分神经元水肿、坏死。P_H 组前角组织轻度水肿, 神经元轻度水肿, 可见较多正常多角形神经元, 核仁清楚, 尼氏体存在, 白质中髓鞘结构清晰, 炎性细胞浸润较少。

2.4 脊髓组织兴奋性氨基酸含量



附图 脊髓前角组织病理学改变。HE × 400

Fig Pathologic observation of the anterior of spinal cords. HE × 400

A: Group S_N; B: Group IP_N(the anterior of spinal cords showed server edema and nearly no normal cell); C: Group P_N; D: Group S_H; E: Group IP_H(the anterior of spinal cords presented punctiform or sheet haemorrhage, the tissue was obviously edema, and the inflammatory cell infiltrated, some neuron disappeared and necrosis presented); F: Group P_H(the tissue of the anterior spinal cords was slightly edema, and the number of the normal neuron was larger than that of the other groups. The inflammatory cells were less than the other groups)

所有实验组脊髓组织中氨基酸含量均高于正常对照组($P < 0.05$), P_N 、 S_H 、 P_H 及 IP_H 组兴奋性氨基酸含量低于 S_N 组及 IP_N 组($P < 0.05$), 4 组中 P_H

组谷氨酸含量最低($P < 0.05$), P_N 、 S_H 及 IP_H 3 组间差异无统计学意义。见表 2。

2.5 脊髓组织 MDA 及 SOD 含量改变

表 2 脊髓组织中兴奋性氨基酸及 MDA、SOD 含量

Table 2 The concentrations of EAA and MDA, SOD in spinal cords

Group	n	Glu($\times 10^{-6}$ mmol/g)	Asp($\times 10^{-6}$ mmol/g)	SOD[U/(mg·pro)]	MDA[nmol/(mg·pro)]
N	10	1962.569 $\pm$ 122.271	791.475 $\pm$ 75.795	46.4 $\pm$ 4.2 Δ	0.65 $\pm$ 0.14 Δ
S_N	10	6489.290 $\pm$ 382.610*	3358.769 $\pm$ 263.147*	5.9 $\pm$ 2.0* Δ	2.04 $\pm$ 0.02* Δ
IP_N	10	6294.611 $\pm$ 249.562*	3190.831 $\pm$ 347.059*	9.0 $\pm$ 5.0* Δ	1.84 $\pm$ 0.04* Δ
P_N	10	3026.286 $\pm$ 246.519* Δ	1365.535 $\pm$ 120.649* Δ	45.3 $\pm$ 4.2*	0.73 $\pm$ 0.08*
S_H	10	2773.845 $\pm$ 793.503* Δ	1840.068 $\pm$ 51.945* Δ	10.3 $\pm$ 4.8* Δ	2.31 $\pm$ 0.08* Δ
P_H	10	2130.593 $\pm$ 191.940* Δ	1480.923 $\pm$ 21.046* Δ	45.7 $\pm$ 6.3*	0.75 $\pm$ 0.13*
IP_H	10	3016.303 $\pm$ 893.423* Δ	2130.850 $\pm$ 51.945* Δ	10.9 $\pm$ 8.4* Δ	2.39 $\pm$ 0.05* Δ

Glu: Glutamic acid; Asp: Aminosuccinic acid. * $P < 0.05$, vs group N; # $P < 0.05$, vs group S_N and group IP_N ; Δ $P < 0.05$, vs group P_H ; Δ $P < 0.05$, vs group P_N and group P_H

与正常对照组比较, 6 个实验组的 SOD 活性均有不同程度降低, MDA 含量升高。 S_N 、 IP_N 、 S_H 及 IP_H 组组间两两比较差异无统计学意义, 与 P_N 、 P_H 两组相比 SOD 活性降低, MDA 含量升高($P < 0.05$), P_N 与 P_H 组间差异无统计学意义。见表 2。

3 讨论

姚俊岩等^[6,7] 在 Zivin 经典模型的基础上进行了一定程度的改进, 成功地建立了左肾下腹主动脉阻断的脊髓缺血再灌注损伤模型, 发现此模型的脊髓耐受缺血的时限为 30 min, 并证实了异丙酚对脊髓的保护作用在一定范围内呈剂量依赖性, 50 mg/kg 经腹主动脉灌注为免脊髓缺血再灌注损伤保护的剂量。因此, 本研究采用该成功模型, 选择 50 mg/kg 为低温异丙酚的灌注剂量, 观察低温异丙酚对脊髓缺血再灌注损伤的保护作用及其对全身的影响, 并探讨低温与异丙酚复合应用是否具有协同作用。

本研究显示低温灌注组(S_H 、 P_H 、 IP_H 组) 均在灌注 15 min 后鼻咽温及肛温有不同程度的下降, 其中以肛温的下降更明显, 最低降至 29℃。肛温明显降低的原因可能为肛温探头放置腹主动脉后方, 与低温灌注液近距离接触相关, 而该 3 组动物的鼻咽温度均在 37℃ 左右, 仅 1 例为 35.3℃, 提示局部灌注低温液体对中心温度无明显影响。

本研究结果还提示灌注 15 min 及开放腹主动脉时, 常温异丙酚组和低温异丙酚组动物的平均动脉压均有一定程度下降, 但血压最低值仍能维持约基础值的 80% (80% $\pm$ 5%), 并于开放后 25 min 恢复至术前水平。既往研究^[6] 结果也提示, 血压下降

的原因可能为少量异丙酚进入血液, 对心血管系统的抑制以及腹主动脉开放后血液再分布对有效血容量的影响等综合因素共同所致。本研究进一步证实 50 mg/kg 异丙酚经腹主动脉局部灌注, 可避免血流动力学的剧烈波动。

本研究发现各组动物神经行为学评分及脊髓组织病理学改变均有明显差异。常温异丙酚组(P_N 组) 及低温灌注组(S_H 、 P_H 、 IP_H 组) 的神经行为学评分均明显优于空白对照组(S_N 组) 及溶媒对照组(IP_N 组), 提示在阻断期间向腹主动脉远端灌注异丙酚及低温液体均能有效地减轻脊髓由于缺血和继后的再灌注所致损伤, 此结果与姚俊岩^[6] 及 Kumagai 等^[7] 的实验发现一致。结果还显示低温异丙酚的各时点的神经行为学评分均优于其余 5 组, 脊髓前角组织病理学改变也以低温异丙酚组脊髓组织损伤最轻, 表明低温与异丙酚两者间存在协同作用。而 S_N 、 IP_N 两组在神经行为学及组织病理学方面均无明显差异, 显示常温脂肪乳无减轻脊髓缺血再灌注损伤的作用。

脊髓缺血再灌注损伤的机制包括蛋白质合成障碍、自由基损伤、钙超载及兴奋性氨基酸毒性等^[8,9]。其中兴奋性氨基酸毒性研究是近年来的研究热点之一。多项研究表明异丙酚可明显减少缺血再灌注损伤的脊髓组织中兴奋性氨基酸的堆积, 减轻其兴奋毒性^[10,11]。Chris 等^[12] 研究认为, 低温也能抑制兴奋性递质的合成、释放和吸收, 降低脊髓组织中兴奋性氨基酸的堆积, 从而阻断毒性物质对神经细胞的损害作用。本研究结果显示, 脊髓缺血后各实验组的脊髓组织中兴奋性氨基酸含量均较正常组织增加, 以 S_N 、 IP_N 两对照组显著, 而低温灌注组

中以 P_H 组最低。提示不同温度异丙酚和低温液体均能通过减少脊髓组织中兴奋性氨基酸的堆积而达到脊髓保护作用, 而低温异丙酚保护作用的可能机制之一为低温复合异丙酚具有明显的抑制兴奋性氨基酸的堆积作用, 但其他机制尚待进一步研究证实。

Murphy 等^[13]发现异丙酚具有抗氧化作用, 可通过保护机体 SOD 活性, 提高机体抗氧化能力, 降低再灌注损伤后脊髓组织中的 MDA 含量, 且该作用与剂量成正比。异丙酚的抗氧化作用是否会随温度的降低而发生改变尚未见报道。本研究结果显示, P_N 、 P_H 两组脊髓组织中 MDA 含量较 S_N 、 IP_N 、 S_H 及 IP_H 组明显降低, 而 SOD 活性升高, 且 P_N 、 P_H 两组间无明显差异, 提示异丙酚的抗氧化作用并未随温度的降低而降低。

综上所述, 以 50 mg/kg 4℃异丙酚经腹主动脉灌注能有效减轻脊髓缺血再灌注损伤, 且其保护作用比同剂量常温异丙酚以及同容积低温生理盐水、低温脂肪乳对脊髓的保护作用更显著。低温异丙酚对脊髓缺血再灌注损伤保护作用的机制可能与显著抑制脊髓组织中兴奋性氨基酸的堆积有关, 且其抗氧化作用不随温度的降低而降低。

参 考 文 献

- 1 Berguer R, Porto J, Fedoranko B, *et al.* Selective deep hypothermia of the spinal cord prevents paraplegia after aortic cross-clamping in the dog model. *J Vas Surg*, 1992; 15(1): 62-72.
- 2 Ross SD, Kern JA. Hypothermic retrograde venous perfusion with adenosine cools the spinal cord and reduces the risk of paraplegia after thoracic aortic clamping. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2000; 119(3): 588-595.
- 3 Kazama S, Miyoshi Y, Nie M, *et al.* Protection of the spinal

cord with pentobarbital and hypothermia. *Ann Thorac Surg*, 2001; 71(5): 1591-1595.

- 4 李治贵, 黄海波, 王泽华等. 异丙酚对家兔主动脉阻断所致脊髓损害的保护作用. *中华麻醉学杂志*, 1999; 19(6): 352-354.
- 5 姚俊岩, 张艳丽, 王泉云等. 腹主动脉灌注不同剂量异丙酚对兔脊髓缺血再灌注损伤的作用. *中华麻醉学杂志*, 2007; 27(3): 247-250.
- 6 姚俊岩, 翁浩, 张兰等. 脊髓缺血再灌注损伤模型的改进及脊髓耐受缺血时限的研究. *四川大学学报(医学版)*, 2007; 38(3): 497-500.
- 7 Kumagai H, Isaka M, Sugawara Y, *et al.* Intra-aortic injection of propofol prevents spinal cord injury during aortic surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006; 29(5): 714-719.
- 8 Meylaerts SA, Kalkman CJ, Haan P, *et al.* Epidural versus subdural spinal cord cooling: cerebrospinal fluid temperature and pressure changes. *Ann Throac Surg*, 2000; 70(1): 222-228.
- 9 John RD, Christopher BS. The role of directly applied hypothermia in spinal cord injury. *Spine*, 2000; 25(12): 2294-2302.
- 10 Sitar SM, Hanifi-Moghaddam P. Propofol prevents peroxide-induced inhibition of glutamate transport in cultured astrocytes. *Anesthesiology*, 1999; 90(5): 1446-1453.
- 11 Hans P, Bonhomme V, Collette J, *et al.* Propofol protects cultured rat hippocampal neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate toxicity. *J Neurosurg Anesthesiol*, 1994; 6(4): 249-253.
- 12 Chris KR, Christopher SC, Takashi N, *et al.* Profound systemic hypothermia inhibits the release of neurotransmitter amino acids in spinal cord ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1995; 110(1): 27-35.
- 13 Murphy PG, Davies MJ, Columb MO, *et al.* Effect of propofol and thiopentone on free radical mediated oxidative stress of the erythrocyte. *Br J Anaesth*, 1996; 76(4): 536-543.

(2008 - 11 - 13 收稿, 2009 - 02 - 27 修回)

编辑 余琳