

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)13-1157-03

乌司他丁对脑缺血再灌注后大鼠海马区神经细胞凋亡及学习记忆功能的影响

高捷¹, 武英² (华北煤炭医学院¹附属医院儿科,²预防医学系预防医学教研室, 河北唐山 063000)

Effect of ulinastatin on neuronal apoptosis and cognitive function after transient focal cerebral ischemia-reperfusion in rats

GAO Jie¹, WU Ying²

¹Department of Pediatrics, Affiliated Hospital, ²Department of Preventive Medicine, Faculty of Preventive Medicine, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China

【Abstract】 AIM: To investigate the effect of ulinastatin on neuronal apoptosis and cognitive function after transient focal cerebral ischemia-reperfusion (IR) in rats. **METHODS:** The focal ischemia-reperfusion model was made by thread embolism of middle cerebral artery. After administration of ulinastatin, the apoptosis of cells was observed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin in situ nick end labeling (TUNEL) technique, and the cognitive dysfunction was evaluated by the method of Morris water maze (MWM). **RESULTS:** A small quantity of apoptosis-positive cells were observed in the CA1 area of hippocampus at 6 h after IR in rats, reaching the peak at 48–72 h. Ulinastatin obviously decreased the apex of apoptosis-positive cells in hippocampus ($P < 0.01$). Morris water maze tests showed that the delitescence of IR group was longer than that in normal group and the delitescence of ulinastatin group was shorter than that in IR group. **CONCLUSION:** Ulinastatin may effectively suppress apoptosis of nerve cells after IR and improve the cognitive function.

【Keywords】 cerebral ischemia-reperfusion; ulinastatin; hippocampus; apoptosis; memory; Morris water Maze

【摘要】目的 研究乌司他丁对大鼠脑缺血再灌注(IR)后海马区神经细胞凋亡及学习记忆功能的影响。方法 线栓法制大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,同时给予乌司他丁治疗,采用TUNEL和水迷宫测试观察海马区细胞凋亡及学习记忆在

脑缺血再灌注后的变化规律。结果 脑缺血组大鼠再灌注后6 h,海马CA1区即出现少量凋亡阳性细胞,于48~72 h达高峰。乌司他丁能够使海马区神经细胞凋亡的高峰明显下调($P < 0.01$)。水迷宫测试结果表明缺血组潜伏期较正常组明显延长,乌司他丁组潜伏期较缺血组明显缩短。结论 乌司他丁能够有效的抑制大鼠脑缺血再灌注后海马区神经细胞凋亡,明显改善学习记忆功能障碍。

【关键词】 脑缺血再灌注; 乌司他丁; 海马; 凋亡; 学习记忆; 水迷宫

【中图分类号】 R453 **【文献标识码】** A

0 引言

乌司他丁作为良好的细胞保护剂被广泛应用于临床,能够明显改善危重症患者的预后。我们利用大脑中动脉缺血再灌注模型,采用原位末端标记TUNEL法和水迷宫测试观察了脑缺血再灌注后海马区神经细胞凋亡及学习记忆变化的规律,进一步探讨了乌司他丁治疗脑缺血的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 取136只健康成年雄性Wistar大鼠(购自北京大学医学部实验动物中心),体质量300~350 g,按体质量编号后,随机分成脑缺血组及乌司他丁治疗组。每组又分别划分为伤后3、6、12、24、48、72、168和336 h等8个时相组,各时相点均为8只大鼠,余8只大鼠作为正常对照组。另取24只大鼠同样随机分为脑缺血组、乌司他丁治疗组及正常对照组,每组8只,进行水迷宫测试。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 大鼠于致伤前0.5 h,经腹腔注射阿托品(0.1 mg/只)。用100 g/L水合氯醛(400 mg/kg)麻醉成功后,按照Kogure等^[1]的方法,采用线栓法可逆性闭塞左侧大脑中动脉,将一顶端加热后呈膨圆、直径0.165 mm的鱼线至颈内动脉内制成中脑动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)缺血1 h后拔出栓子。正常对照组不做任何处理。

1.2.2 给药 乌司他丁治疗组大鼠缺血后即刻经腹

收稿日期 2004-09-18; 修回日期 2004-11-10

作者简介 高捷(1971-),女(汉族),河北省唐山市人,硕士,主治医师。Tel.(0315)3725984 Email.gaojiecong1997@yahoo.com.cn

腔注射乌司他丁 1 万 U/(kg·次), 每 24 h 1 次直至各时相点处死。脑缺血组及正常对照组在相同时间内给予等量生理盐水腹腔注射。

1.2.3 取材 于上述各时相点, 对动物用 100 g/L 水合氯醛 (450 mg/kg) 进行深度麻醉。开胸 40 g/L 多聚甲醛经心灌注固定 10 min 后, 断头取出脑组织, 置于 40 g/L 多聚甲醛后固定 12~24 h (4℃)。取出固定液中脑组织标本, 常规脱水、石蜡包埋。冠状面连续切片, 厚度约 10 μm, 经粘片剂处理过的载玻片捞片, 置于 60℃ 烤箱烘烤 1 h 后, 按下述方法进行染色。

1.2.4 细胞凋亡检测 (TUNEL) 严格按照德国 BM 公司 *in situ* cell death detection kit (AP) 说明书操作。

1.2.5 Morris 水迷宫测试 严格按照 Smith 等^[2]的方法, 伤后 7、8、9 和 10 d 进行学习记忆功能测试。

1.2.6 图像分析 采用 CMIAS-真彩色医学图像分

析系统 (由北京航空航天大学提供) 及 OLYMPUS 摄像显微镜进行海马区阳性细胞计数 (个/400 倍视野)。

统计学处理: 实验中所得数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经 Access 数据库整理后用美国 SAS 统计软件 6.12 TS 020 for windows, 进行 *t* 检验或方差分析。以双侧 $P \leq 0.05$ 为差异在统计学上有显著性意义。

2 结果

2.1 海马区神经细胞凋亡检测结果 正常对照组未见凋亡阳性细胞。脑缺血组大鼠再灌注后 6 h, 海马 CA1 区即出现少量凋亡阳性细胞; 再灌注后 12 h 阳性细胞数量逐渐增多, 于 24~72 h 达高峰, 168 h 凋亡阳性细胞数量有所下降。与乌司他丁治疗组同时相点比较, 伤后 24、48、72 及 168 h 差异有显著性 (Tab 1)。

表 1 脑缺血再灌注组及乌司他丁治疗组海马 CA1 区神经细胞凋亡 (个/400 倍视野)

Tab 1 Nerve cell apoptosis in the CA1 area of hippocampus in IR group and ulinastatin group

($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	Phase/h							
	3	6	12	24	48	72	168	336
IR	0	9.2 ± 2.5	16.3 ± 3.7	23.3 ± 5.3	26.2 ± 6.5	25.6 ± 6.3	13.3 ± 3.1	7.1 ± 1.6
Ulinastatin	0	9.0 ± 2.3	15.1 ± 3.0	17.2 ± 4.4 ^a	18.5 ± 4.7 ^a	18.0 ± 4.6 ^a	8.5 ± 2.1 ^a	4.9 ± 0.9 ^a

^a $P < 0.05$ vs IR. IR: ischemia-reperfusion.

2.2 Morris 水迷宫测试结果 缺血组伤后第 7、8、9、10 日搜索安全岛潜伏期较正常组明显延长。乌司他丁治疗组伤后第 8、9、10 日搜索安全岛潜伏期较创伤组明显缩短, 搜索轨迹较创伤组理想 (Tab 2)。

表 2 各组 Morris 水迷宫测试潜伏期

Tab 1 Delitescence of Morris water maze tests in evrey group

(second) ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	Phase/d			
	7	8	9	10
Normal	159 ± 33	101 ± 23	42 ± 13	27 ± 8
IR	181 ± 34	131 ± 32	80 ± 19 ^a	52 ± 15 ^a
Ulinastatin	178 ± 33	98 ± 25	44 ± 12 ^b	30 ± 8 ^b

^a $P < 0.05$ vs normal; ^b $P < 0.05$ vs IR. IR: ischemia-reperfusion.

3 讨论

乌司他丁是从人类尿液中提取精制而成的一种内源性尿胰蛋白酶抑制剂, 具有抑制胰蛋白酶和中性粒细胞弹性蛋白酶的作用, 它是人体内的一种内源性保护物质, 对水解酶活性亢进和炎性介质升高导致的

一些临床症状均有较好的治疗作用。研究表明^[3], 乌司他丁分子中存在多种酶结合位点, 因此对酶抑制具有广谱性和同时性, 能够抑制胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶、透明质酸酶、弹性蛋白酶和纤溶酶等酶活性, 具有清除自由基及抑制炎性介质的释放, 抑制蛋白质分解代谢亢进等药理作用。早期仅将其作为胰蛋白酶抑制剂治疗急性胰腺炎。据张平等^[4]报道, 大手术以后和严重创伤时尿中的乌司他丁活性升高, 其作用可能是改善循环障碍和能量代谢异常, 同时还有增强肾上腺皮质激素的作用。乌司他丁在治疗缺血性脑损害中的应用鲜见报道, Yano 等^[5]认为乌司他丁能够明显减轻局灶性脑缺血再灌注损伤。乌司他丁可能通过抑制 NOS 活性, 减少 NO 的生成, 保护血脑屏障, 减轻脑水肿, 保护脑组织^[6]。本研究应用 TUNEL 法对大鼠 MCAO 模型进行凋亡细胞检测, 结果显示脑缺血后海马区 CA1 区存在着神经细胞凋亡现象, 凋亡阳性细胞于再灌注 6 h 出现 2~3 d 达高峰, 伤后 7 d 明显下降。乌司他丁组凋亡细胞高峰明显下调。乌司他丁治疗组于伤后 8、9 及 10 d, Morris 水迷宫测试潜伏期明显低于缺血组 ($P < 0.05$), 而于正常组相比

无明显差异。运动轨迹图像分析显示,正常对照组及乌司他丁治疗组大鼠随时间在搜索策略的改变上也较创伤组更为理想。我们认为乌司他丁能够减少海马区神经细胞凋亡,促进学习记忆功能的改善,其副作用较小,是治疗缺血性脑损伤的有效药物。在以后的研究中我们将该药应用于新生儿缺血缺氧性脑病的治疗,进一步观察其疗效。

【参考文献】

- [1] Kogure K, Nagasawa H. Correlation between blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 1989, 17(9): 1304-1308.
- [2] Smith DH, Okiyama K, Kenneth D, et al. Evaluation of memory dysfunction following experimental brain injury using the Morris water

maze [J]. *Neurotrauma*, 1994, 26(5): 8259-8262.

- [3] Oizumi R, Kanai H, Maezawa A, et al. Therapeutic effect so full-nastation experimental crescetic plomerulone phritis in rats [J]. *Nephron*, 2000, 84(4): 347-349.
- [4] 张平, 石峰. 乌司他丁在重型颅脑损伤中的应用 [J]. 临床外科杂志, 2001, 9(6): 404-405.
- Zhang P, Shi F. The application of Ulinastatin in craniocerebral injury [J]. *J Clin Surg*, 2001, 9(6): 404-405.
- [5] Yano T, Anraku S, Nakayama R, et al. Neuroprotective effect of urinary trypsin inhibitor against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Anesthesiology*, 2003, 98(2): 465-473.
- [6] 张华芳, 唐勇, 姜保芹. 乌司他丁对鼠缺血性脑水肿的防治作用 [J]. 潍坊医学院学报, 2003, 25(1): 29-31.
- Zhang HF, Tang Y, Jiang BQ. Experimental study of preventive and treating effects of Ulinastatin on the ischemic cerebral edema [J]. *Acta Acad Med Weifang*, 2003, 25(1): 29-31.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2005)13-1159-01

腹主动脉瘤腔内隔绝术 1 例的术中护理配合

王倩, 王宇, 段宝玲, 孙巧惠

(第四军医大学西京医院外科手术室, 陕西 西安 710033)

【关键词】腹主动脉瘤 腔内隔绝术 护理

【中图分类号】R732.2 【文献标识码】B

1 临床资料 患者男性, 71 岁, 因发现腹部搏动性肿块 1 a 余入院。入院诊断: 腹主动脉瘤(波及双侧髂总动脉)。既往曾有高血压病史, 心电图检查提示心肌缺血性改变, 吸烟史近 50 a。手术时于腹股沟韧带中点下方处做约 5 cm 长纵行小切口, 暴露双侧股动脉。切开右侧股动脉, 插入导丝至瘤体上方, 在导丝指引下置入 Pigtail 导管行瘤体造影评估。以输送器将带外鞘管的内支撑人工血管主体送入预定位置, 抽出外套管, 人工血管因弹性形变展开后, 将造影剂注入输送器球囊(压力约 101 kPa), 分段扩张人工血管, 使人工血管上端固定于肾动脉下方, 下端固定于左侧髂总动脉。切开左侧股动脉, 插入导丝经侧腿安装口处至腹主动脉瘤体上方, 与置放主体人工血管方式相同置入侧腿, 上方固定于侧腿安装口处, 下方固定于左侧髂总动脉。经再次造影证实人工血管置放成功, 无内漏后, 缝合双侧股动脉, 关闭创面, 敷料覆盖切口, 术毕。手术前所需的器械应全面检查测试, 并带入数字减影(DSA)室, 手术器械包括普通外科常用手术器械, 血管器械, 头灯, 高频电刀, 电动吸引器, 加压输血器等。若手术失败时, 需备好中转开腹、行腹主动脉瘤切除人工血管置换术所需的器械、敷料

及各型号无创血管缝线、肝素钠、鱼精蛋白。

2 讨论 在我国, 腹主动脉瘤的病死率居所有致死性疾病的第 10 位, 死亡原因为瘤体破裂所致的大量快速出血。此手术步骤较复杂, 手术进行顺利与否与护士配合密切相关。术前应先在患者上肢建立至少两处液体通路, 以备手术中急用。同时, 应配合麻醉医生建立中心静脉压测压装置及有创动脉压测压装置。因 DSA 室不同于常规手术室(通常位于放射科, 与手术室距离较远, 且室内仪器较多), 手术台也不同于常规手术台, 所以手术消毒铺单具有其特殊性。应准备较多中单将手术台面完整覆盖, 同时铺单中应避免手臂及手术衣无菌区被 DSA 设备污染。铺单完成后, 术野上方 DSA 发射探头应以无菌塑料套加以保护, 以免术中污染术者手臂。血管外科手术通常需全身抗凝, 术中巡回护士应按手术医生要求配制好肝素及鱼精蛋白(加入生理盐水), 以备术中应用。若此手术成功完成, 术中出血量较少, 患者常不需输血。但如手术失败, 则必须马上中转开腹手术, 需血量大。巡回护士应准备加压输血器, 填好取血单, 术前应与血库联系协调, 随时准备大量取血、输血。术前应将手术所需之特殊器械及人工血管、各型导管放于妥善处, 以备术中应用。术中应按手术医生要求传递所需物品, 尤其是人工血管及各型导管, 因其价格昂贵, 且长度大, 术中台下、台上传递过程中应仔细小心, 避免被污染或掉落于地面。因 DSA 室通常与常规手术室有一定距离, 因此术前应周密讨论, 列好物品清单, 备齐后妥善保管, 术前带入 DSA 室, 以免术中因急需物品产生忙乱现象。血管手术稍有感染则意味着手术失败, 因此无菌操作至关重要。所有参与手术人员均要有高度的责任感, 加强无菌观念, 互相监督, 疑有污染时应立即采取补救措施。DSA 室应在术前充分消毒, 因 DSA 室仪器设备体积大, 且结构复杂, 术中应避免手术人员及器械物品在传递过程中被污染。术中包括护士在内的所有手术人员都应着好铅衣, 以避免放射线对身体的损害。

收稿日期 2005-01-26; 修回日期 2005-03-16

作者简介: 王倩(1977-), 女(汉族), 辽宁省朝阳市人, 护师。Tel.

(029) 83375253 Email: Wangqian1977@sohu.com

编辑 袁天峰