

大鼠急性脊髓损伤后不同复苏液体治疗的比较

徐振东, 石学银*, 何星颖, 刘 刚 (第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 研究大鼠急性高位脊髓损伤后, 不同复苏液体治疗对左心室功能及伤段脊髓血脊屏障和含水量的影响。 **方法:** 将 C7 脊髓损伤 15 min 后的大鼠随机分为 4 组 ($n=8$): 不补液的对照组、7.5% 高渗盐水治疗组 (HS 组)、6% 羟乙基淀粉组 (HES 组) 和平衡液组 (BS 组)。补液各组于 4 min 内均予 4 ml/kg 的相应液体, 继以 $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 持续输注, 观察记录 5、15、30 min 时血流动力学的变化。30 min 时注射 0.5% 伊文思蓝 (EB) 1 ml, 2 h 后取伤段脊髓, 测含水量和 EB 含量。 **结果:** C7 损伤后, 各组的心率 (HR) 在不同时点无明显区别。平均动脉压 (MAP)、左室收缩压 (LVSP)、左室内压力变化最大速率 ($\pm dp/dt_{\max}$) 比较显示, 补液 5 min 时, HS 组显著高于对照组 ($P<0.05$); 15、30 min 时 HS 组和 HES 组的都显著高于对照组 ($P<0.05$); 而 BS 组在不同时点都与对照组无显著差异。HS 和 HES 组的脊髓组织含水量与 EB 含量均低于对照组, BS 组含水量高于对照组 ($P<0.05$)。 **结论:** 高位脊髓损伤后早期以高渗盐水和 6% 羟乙基淀粉复苏, 可以改善左心功能, 一定程度上都可减轻伤段脊髓的水肿。平衡液对心功能没有改善作用, 却可加重脊髓的水肿。

[关键词] 脊髓损伤; 液体疗法; 心脏功能试验; 毛细血管通透性

[中图分类号] R 651.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)02-0170-04

Comparison of different fluid therapies following acute spinal cord injury in rats

XU Zhen-dong, SHI Xue-yin*, HE Xing-ying, LIU Gang (Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To assess the effects of different fluid therapies on myocardial function, blood-spinal cord barrier and water content of spinal cord after acute high level spinal cord injury (SCI) in rats. **Methods:** Thirty-two male SD rats, weighing (300 ± 20) g, were anesthetized intraperitoneally with pentobarbital (40 mg/kg). A cervical laminectomy extending from C6-T1 was performed and the experimental acute cervical 7 spinal cord injury model was created by modified Allen's method, and then the rats were randomly divided into 4 groups ($n=8$): control group (C group) with no fluid resuscitation, 7.5% hypertonic saline group (HS group), 6% hydroxyethyl starch group (HES group) and balanced solution group (BS group). Fifteen minutes after injury, rats of each treatment groups were given (*iv.* at 4 ml/kg) above-mentioned fluids in 4 min, then continuously infused at a rate of $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ over for 30 min. MAP, HR, left ventricular systolic pressure (LVSP), and $\pm dp/dt_{\max}$ were recorded at 5, 15 and 30 min. At 30 min, 0.5% Evan's blue (EB) 1 ml was injected *iv.* Two hours later the animals were sacrificed and the injured segments of spinal cords were removed for determination of water content and EB content. **Results:** After SCI there were no differences of HR at different time points in each group. At 5 min, HS significantly increased MAP, LVSP and $\pm dp/dt_{\max}$ compared with control group ($P<0.05$). At 15 and 30 min, these variables of both HS group and HES group were much higher than those of control group ($P<0.05$), while these of BS group had no significant changes. Compared with control group, spinal cord water and EB content were significantly lower in HS group and HES group, but water content in BS group were markedly higher ($P<0.05$). **Conclusion:** Hypertonic saline and hydroxyethyl starch used for early resuscitation of acute high level spinal cord injury can improve myocardial function and attenuate spinal cord edema. Balanced solution can aggravate issue edema instead of improving hemodynamics.

[KEY WORDS] spinal cord injury; fluid therapy; heart function test; capillary permeability

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(2): 170-173]

急性高位脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 对循环有显著的影响, 损伤后, 即刻会出现血压下降, 心率减慢, 心室功能低下。血流动力学的异常会严重威胁患者的生命, 同时加重脊髓的损伤。早期的液体复苏是整个救治过程中的一个重要环节。本研究通过补充不同液体, 比较其对急性 SCI 大鼠左心室功能和脊髓血脊屏障的影响, 探讨适合的复苏液体。

1 材料和方法

1.1 动物准备 雄性 SD 大鼠 (第二军医大学实验

[基金项目] 全军医药科研“十五”规划课题面上课题 (03M004); 上海市卫生局科技发展基金 (024097)。

[作者简介] 徐振东 (1976-), 男 (汉族), 硕士, 住院医师。

* Corresponding author. E-mail: btxzd123@126.com

动物中心提供),体质量(300±20)g。40 mg/kg 戊巴比妥腹腔注射麻醉后,将心电图针状电极插入相应部位。分离右侧颈总动脉,插入 PE50 管,一端接 MPA2000 多道生理记录仪(上海奥尔科特生物科技有限公司,采用心功能分析软件),在电脑屏幕显示的压力波形指导下将管插入左心室。分离一侧股动脉,插管监测平均动脉压。分离左侧颈外静脉,置管用于补液。

1.2 SCI 大鼠模型的制备及分组 暴露大鼠颈椎,蚊式剪剪除 C7 椎板,暴露硬脊膜。用改良 Allens 打击法^[1],造成脊髓中度损伤(50 g·cm)。打击成功的标志:撞击处的脊髓立即变为灰暗,尾巴痉挛性摆动,双下肢回缩性扑动,随后呈弛缓性瘫痪。将大鼠模型随机分为不补液的对照组(C组)、7.5%高渗盐水组(HS组)、6%羟乙基淀粉组(HES组)、平衡液组(BS组),每组8只。补液组均于4 min内给予4 ml/kg的相应液体,继以静脉推注泵(费森尤斯卡比公司)按10 ml·kg⁻¹·h⁻¹持续推注30 min。

1.3 血流动力学指标 所有大鼠SCI后15 min开始补液,并记录补液5、15、30 min时平均动脉压(MAP)、心率(HR)、左室收缩压(LVSP)、左室内压

力变化最大速率(±dp/dt_{max})。

1.4 组织毛细血管通透性指标 30 min时注射伊文思蓝(EB)1 ml,待EB循环2 h后处死大鼠,取伤段脊髓,距离伤段中点上0.5 cm处取约1.5 cm称取湿重(W),然后置于烘箱中24 h,称取干重(D),含水量=(W-D)/W×100%。伤段中点下取约1 cm脊髓,组织匀浆,离心(10 000 r/min,20 min)取上清。应用荧光分光光度计测量荧光密度,根据标准品所做的EB标准曲线计算出样品EB含量。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素的ANOVA分析(SPSS 10.0统计软件)。

2 结果

2.1 血流动力学变化 SCI前所有大鼠心电图及血流动力学指标无统计学差异。各组SCI大鼠经相应复苏液体治疗后的血流动力学变化见表1。各组HR在不同时点无显著性差异,补液5 min时HS组MAP、LVSP、±dp/dt_{max}均高于对照组(P<0.01),另两组同对照组无显著差异。15 min、30 min时,HS组和HES组的MAP、LVSP、dp/dt_{max}均较对照组升高(P<0.05)。

表1 各组SCI大鼠经相应复苏液体治疗后的血流动力学变化
Tab 1 Hemodynamic changes of each group at different time points

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

Group	Time (t/min)	HR (f/min ⁻¹)	MAP (p/mmHg)	LVSP (p/mmHg)	+dp/dt _{max} (mmHg·s ⁻¹)	-dp/dt _{max} (mmHg·s ⁻¹)
C	5	335±11	79.30±5.16	130.27±17.58	4 190.85±61.12	3 467.51±111.38
	15	319±12	77.59±6.42	122.85±11.85	4 005.76±88.20	3 271.39±126.55
	30	301±19	71.98±7.28	116.89±13.79	3 881.55±128.85	3 123.82±198.25
HS	5	329±15	84.61±4.79*	136.85±14.64*	4 594.87±204.87*	3 941.78±205.87*
	15	318±17	84.32±5.60*	134.41±13.40*	4 590.17±233.88*	3 973.07±187.41*
	30	305±12	85.64±6.14*	137.64±13.62**	4 658.18±219.27**	4 028.63±238.69**
HES	5	333±9	80.77±8.05	129.50±12.32	4 150.66±118.45	3 457.42±186.18
	15	321±10	83.97±6.91*	131.65±14.11*	4 474.64±245.05*	3 994.17±181.75*
	30	307±20	83.18±7.12*	132.75±14.08*	4 561.29±159.40**	3 989.71±183.66*
BS	5	340±21	81.38±7.78	130.93±13.03	4 253.43±188.19	3 561.23±226.11
	15	324±8	78.12±5.13	124.11±12.33	4 051.32±144.80	3 378.82±249.39
	30	309±14	76.03±7.21	117.42±15.20	3 883.52±183.69	3 122.50±171.16

* P<0.05, ** P<0.01 vs group C of same time point; 1 mmHg=0.133 kPa

2.2 含水量及EB含量 HS组和HES组的含水量(64.42±1.33和64.19±2.10)及EB含量(9.87±0.31和10.09±2.03)均低于对照组(70.23±2.01和14.61±1.23)。

BS组含水量(7.39±1.89)则高于对照组(P<0.05),其EB含量(15.11±1.30)与对照组无统计学差异。

3 讨论

高位SCI对心肌有损伤作用。支配心脏的交感神经节前纤维起源于脊髓T1~T5节段的中间外侧柱,T1以上的脊髓损伤后,脊髓组织发生出血、水肿变性、坏死等原发或继发性病理改变,导致整个心脏交感神经功能受损,阻断了高级中枢对心脏的交感

支配,副交感神经相对兴奋,冠状动脉收缩。同时在脊髓损伤的瞬间,机体因强烈的应激,儿茶酚胺在体内瞬间集聚、释放^[2],心肌氧耗增加,冠脉却可能收缩,导致氧供和氧耗失衡,使心肌受损。随后由于损伤平面以下的血管扩张,全身血压下降,也会影响到冠脉的血供。陈辉等^[3]于颈髓损伤后72 h内测定患者的心肌酶谱,发现均显著增高。本实验也发现大鼠C7损伤后,心肌收缩功能在持续下降。

损伤处的脊髓因全身性低血压(神经源性休克),局部出血,微循环障碍,血流减少(血管痉挛、血栓形成),使损伤局部供血供氧不足。损伤后又产生一些生物化学因子,如氧自由基、一氧化氮、花生四烯酸代谢产物、内皮素等,同时激活了血小板和白细胞,使血管内皮细胞功能障碍,毛细血管的通透性增高,液体渗出增多,局部组织水肿,进一步增加局部组织压力,使微血管阻塞,减少氧的利用,加重脊髓的损伤^[4]。因此,在急性SCI的救治中,既要维持循环功能的稳定保证重要器官的灌注,也要考虑对损伤脊髓的保护。液体治疗在脊髓损伤后的急救中占有重要的地位,其不仅可以稳定和恢复血流动力学,而且对损伤的脊髓也有一定的影响。

近年来,高渗液体作为创伤后复苏液体的优势逐渐为人们重视。有不少研究发现,在在体动物模型中,一次性输入高渗氯化钠溶液能显著增强心肌收缩力,增加心输出量和血压^[5]。在离体心脏灌注模型中,采用高渗液体灌注也会增强心肌收缩力^[6]。本实验采用4 min内输入4 ml/kg的高渗液体继之以 $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 维持输注,也发现在第5分钟时,血压及LVSP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 即有显著的提高,在随后的时段内,也高于对照,与既往的研究相符。有关高渗盐水增强心功能的机制有很多推测^[6],可能是其通过升高局部渗透压,直接作用于心肌纤维,升高细胞内钠离子浓度,促进与细胞外钙的交换,加强心肌收缩;也可能是使冠脉扩张,增加心肌的血供;也可能与自主神经有关,但在本研究中,心交感的通路已被阻断,具体是何种机制还待研究。

6% HES是新一代的中相对分子质量低取代级羟乙基淀粉,是目前临床上常用的胶体溶液,扩容效果持久而良好。Bold等^[7]发现HES能够提高脓毒症患者的CI、氧供指数(DO_2),同时升高右室射血分数(RVEF)。本实验发现HES可以提高MAP及LVSP、 $\pm dp/dt_{\max}$,但其作用晚于HS,其对心功

能的改善作用可能与其提高血容量,改善冠脉循环,减少循环中的有害物质作用有关。

SCI后血脊屏障损害是引起继发损伤的因素。EB与血清蛋白结合形成伊文思蓝-白蛋白复合物(ESA),具有透过损伤血脑(脊)屏障特点,也是作为观察血脑(脊)屏障功能损伤指标的一种有效的定量研究方法^[8]。正常情况下,ESA不能通过血脊屏障,但在SCI后血脊屏障完整性被破坏,ESA得以进入组织间隙。EB的渗出量与血脊屏障的破坏程度呈正相关。本实验中,HS组的脊髓含水量和EB含量都较对照低,说明可以减轻血脊屏障的损害和脊髓水肿。这可能与其提高血管内的晶体渗透压,抑制局部黏附分子表达,减轻局部微循环的继发性损伤有关。当然不能排除本实验中,由于中度损伤的SCI模型的血脊屏障相对较完整,而使得高渗盐水的脱水作用也相对较明显。Sumas等^[9]研究发现,在大鼠SCI 1 min后输注高渗液体,可以显著改善大鼠下肢的运动功能,损伤脊髓的病理切片也显示该组的损伤减轻,他们推断可能与高渗盐水改善了损伤局部的血流量有关。但在文后的评论中,文献^[9]认为该研究没有同时观察血压的变化,此外也没有评测脊髓的水肿情况,是研究的不足。为此,在我们的研究中,同时观察了血流动力学的变化及脊髓水肿情况,而且将液体复苏的时间窗(time window of treatment)推迟到15 min以期更接近临床救治时间。

本实验中HES对脊髓的含水量和EB都有降低作用。一般认为中相对分子质量的羟乙基淀粉具有一定的防止和堵塞毛细血管漏的作用。在兔的脊髓缺血再灌注模型中使用中相对分子质量HES可以减轻脊髓的损伤,减少EB的漏出^[10]。吴镜湘等^[11]对油酸损伤型肺损伤大鼠输注不同液体后比较发现,HES可以显著降低肺组织的含水量和EB含量,并认为6%羟乙基淀粉减少毛细血管渗漏并非单纯的渗透压作用,可能还与胶体生物大分子作用于内皮细胞糖蛋白、毛细血管孔隙、基底膜有关。当然HES还能够抑制黏附分子表达和转录因子NF- κ B的激活,减少中性粒细胞对毛细血管的损伤^[12]。

用平衡液复苏SCI大鼠,补液5 min时MAP的均值似较对照略高,但未有显著意义。同对照组相比,各个时点的血流动力学均没有明显改变,相反

脊髓组织的含水量却明显高于对照组。

综上所述,高位脊髓损伤对血流动力学有显著的影响,可以导致心功能低下。损伤后以高渗盐水复苏,可以早期改善左心功能,同时可以减轻伤段脊髓的水肿。6%羟乙基淀粉有一定的稳定循环的作用,但其改善心功能的作用晚于高渗盐水,在一定程度上也可以减轻伤段脊髓的水肿情况。平衡液对心功能没有改善作用,却可加重脊髓的水肿。因此,高位脊髓损伤后,早期使用高渗盐水和6%羟乙基淀粉复苏既可以改善心功能,对脊髓损伤可能也有一定的保护作用。

[参考文献]

- [1] 肖年来,姚共和. 急性脊髓损伤模型的建立[J]. 中国中医骨伤科杂志,1999,7(6):50-51.
- [2] 夏建华,石学银. 脊髓损伤病人的麻醉处理[J]. 国外医学·麻醉与复苏分册,2001,22(5):281-283.
- [3] 陈辉,林建东,林才朱,等. 颈髓损伤截瘫急性期血清心肌酶的变化及麻醉处理[J]. 福建医科大学学报,2000,34(1):63-64.
- [4] Tator CH, Koyanagi I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury[J]. *J Neurosurg*, 1997, 86(3):483-492.
- [5] 周学武,胡德耀,刘良明. 不同组方的高渗氯化钠-醋酸钠溶液对创伤失血性休克大鼠心肌收缩功能和动脉血气的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2001, 13(6):358-361.
- [6] 周继红,朱佩芳,刘大维,等. 高渗盐溶液离体灌注对大鼠离体心脏功能的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2000, 22(5):420-423.
- [7] Bold J, Heesen M, Muller M, *et al*. The effect of albumin versus hydroxyethyl starch solution on cardiorespiratory and circulatory variables in critically ill patients [J]. *Anesth Analg*, 1996, 83(2):254-261.
- [8] Zkeda Y, Wang M, Nakazawa S. Simple quantitative evaluation of blood brain barrier disruption in vasogenic brain edema [J]. *Acta Neurochir*, 1994, 60(Suppl):119-120.
- [9] Sumas ME, Legos JJ, Nathan D, *et al*. Tonicity of resuscitative fluids influences outcome after spinal cord injury [J]. *Neurosurgery*, 2001, 48(1):167-173.
- [10] Wisselink W, Patetsios P, Panetta TF, *et al*. Medium molecular weight pentastarch reduces reperfusion injury by decreasing capillary leak in an animal model of spinal cord ischemia [J]. *Vasc Surg*, 1998, 27(1):109-116.
- [11] 吴镜湘,徐美英,张富军,等. 羟乙基淀粉对油酸损伤型大鼠肺毛细血管通透性的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2003, 23(3):197-200.
- [12] Oreopoulos GD, Hamilton J, Rizoli SB. *In vivo* and *in vitro* modulation of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression by hypertonicity [J]. *Shock*, 2000, 14(3):409-414.

[收稿日期] 2004-06-18

[修回日期] 2004-09-21

[本文编辑] 李丹阳

Homology modeling of lanosterol 14alpha-demethylase of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* and insights into the enzyme-substrate interactions

Sheng C, Zhang W, Zhang M, Song Y, Ji H, Zhu J, Yao J, Yu J, Yang S, Zhou Y, Zhu J, Lu J (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] The crystal structure of 14alpha-sterol demethylase from *Mycobacterium tuberculosis* (MT_14DM) provides a good template for modeling the three dimensional structure of lanosterol 14alpha-demethylase, which is the target of azole antifungal agents. Homologous 3D models of lanosterol 14alpha-demethylase from *Candida albicans* (CA_14DM) and *Aspergillus fumigatus* (AF_14DM) were built on the basis of the crystal coordinates of MT_14DM in complex with 4-phenylimidazole and fluconazole. The reliability of the two models was assessed by Ramachandran plots, Profile-3D analysis, and by analyzing the consistency of the two models with the experimental data on the P450(14DM). The overall structures of the resulting CA_14DM model and AF_14DM model are similar to those of the template structures. The two models remain the core structure characteristic for cytochrome P450s and most of the insertions and deletions expose the molecular surface. The structurally and functionally important residues such as the heme binding residues, the residues lining the substrate access channel, and residues in active site were identified from the model. To explore the binding mode of the substrate with the two models, 24(28)-methylene-24,25-dihydrolanosterol was docked into the active site of the two models and hydrophobic interaction and hydrogen-bonding were found to play an important role in substrate recognition and orientation. These results provided a basis for experiments to probe structure-function relationships in the P450(14DM). Although CA_14DM and AF_14DM shared similar core structural character, the active site of the two models were quite different, thus allowing the rational design of specific inhibitors to the target enzyme and the discovery of novel antifungal agents with broad spectrum.

[*J Biomol Struct Dyn*, 2004, 22(1):91-99]