

灌注不同时间段用电针针刺穴位:百会和曲池,强度“1”档,频率7次/秒,电压0.7伏,电针针刺时间都为30分钟。

1.5 测定样品制备 上述各组大鼠缺血再灌注24h,断头取脑,在冰冷状态下剥除脑膜,分离合并大脑皮层和海马,称重,加入9倍体积的50mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH=7.5)匀浆,冷冻离心机中2000r/min离心10分钟,弃沉淀,得去核上清,将此上清14000r/min离心18分钟(4℃),得去膜上清供胞液NOS和NO测定,沉淀为破碎细胞膜、线粒体等。用50mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH=7.5)2ml混匀,供NOS和NO测定。

1.6 NOS和NO测定 NOS和NO的测定采用南京建成生物工程研究所提供的分光光度法,样品蛋白定量采用lowry法^[3]。

2 结果

表1 各组大鼠大脑皮层和海马NOS活性比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

	胞液NOS (U/mg·pr)	膜NOS (U/mg·pr)
假手术组	2.10±0.21	0.46±0.1
缺血再灌注组	2.79±0.26*	0.52±0.22*
缺血再灌注即刻针刺组	2.61±0.26	4.67±0.64 [△]
缺血再灌注3h后针刺组	2.00±0.16 [△]	0.42±0.03

* $P < 0.01$ (与假手术组相比) $\Delta P < 0.01$ (与缺血再灌注组相比)

从表1可以看出,缺血再灌注组NOS活性显著升高,再灌注的不同时间中,电针针刺后胞液中NOS活性下降,以再灌注3h后针刺NOS下降较明显,膜中NOS活性在再灌注即刻针刺时反而增加,再灌注3h后针刺有下降趋势。

表2 各组大鼠大脑皮层和海马NO含量比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

	胞液NO ($\mu\text{mol/g} \cdot \text{pr}$)	膜NO ($\mu\text{mol/g} \cdot \text{pr}$)
假手术组	1.49±0.24	0.99±0.14
缺血再灌注组	5.99±0.72*	2.29±0.48*
缺血再灌注即刻针刺组	2.37±0.34 ^{△△}	5.74±0.64 ^{△△}
缺血再灌注3h后针刺组	2.21±0.24 [△]	1.52±0.19 [△]

* $P < 0.01$ (与假手术相比) $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ (与缺血再灌注组相比)

从表2可以看出,缺血再灌注组NO含量显著升高,再灌注不同时间段中胞液NO含量都显著下降,而膜中NO含量在再灌注即刻针刺组反而升高,当再灌注3h后针刺膜中NO也明显下降。

3 讨论

自从Yamamoto实验首次证明缺血后血流重建可导致血液自由基升高,临床症状加重后,自由基在缺血再灌注损伤中

的作用已逐渐为医学界公认。很多资料证明,自由基引起的脑组织脂质过氧化损伤产生于缺血期,激化于再灌注期,因此自由基连锁反应是脑缺血再灌注组织损伤的核心环节^[4]。NOS广泛分布于神经元及血管内皮细胞中,精氨酸在NOS的催化下生成瓜氨酸和NO。从我们的实验结果显示:在缺血再灌注24h内,脑内NOS活性增高,NO含量显著增加。现已证明兴奋性氨基酸引起的cGMP变化需要NO参与,突触后NMDA受体被激活,刺激了NOS,引起NO合成。NO通过扩散作用在相邻的突触前神经末梢和周围星状胶质细胞上,再激活可溶性的鸟苷酸环化酶,从而提高cGMP水平,激活磷酸二酯酶,使花生四烯酸(AA)含量升高,在AA代谢过程中可产生超氧阴离子。自由基一旦与内源性NO相互作用,就会形成过氧亚硝酸盐离子,这些离子可形成过氧亚硝酸或分解产生过氧化基团、NO₂,所有这些对蛋白质、核酸和脂膜都有极大的损害作用^[5]。这就提示我们用降低脑中NOS活性和NO含量的方法来治疗缺血再灌注损伤。我们采取的不同再灌注时间段用电针针刺百会穴和曲池穴,结果显示:在缺血再灌注3h时针刺,胞液和膜中NOS活性和NO都明显下降,但在缺血后再灌注即刻电针胞液中NOS和NO明显下降而膜线粒体中的NOS活性和NO含量反而升高。

综上所述,在脑缺血再灌注损伤过程中,自由基起重要作用,在缺血再灌注恰当的时间段内针刺可以抑制NOS活性,降低NO含量,从而降低自由基产生的迟发性神经元损伤。故认为(在特定的时相)针刺百会、曲池穴对提高缺血性脑部疾患的疗效具有重要意义。

参考文献

- 1 Dawson VL, et al. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary corticocultures. Proc Natl Acad USA, 1991;88:6368
- 2 Murphy ME, sies H. Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. Proc Natl Acad sic USA, 1991;88:10860
- 3 lowry OH, et al. Protein measurement with the FoLin Phenol reagent. J Biol chem, 1951;193:265
- 4 许燕,钱晖,卢步峰. 脑缺血再灌注对大鼠不同脑区丙二醛、谷胱甘肽含量及谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响. 中国危重病急救医学, 1997;9(6):321
- 5 柯开富,包仕尧. 一氧化氮与缺血性神经元损伤. 中风与神经疾病杂志, 1996;13(4):254

(收稿日期:1999-09-06)

514-516

超声在肢体隔离性灌注兔实验模型中的应用*

南京医科大学第一附属医院影像科(210029)

王永利 李麟荪 王杰

冯耀良 施海彬 王卫东 彭晓静

摘要 目的:使用Doppler超声测定股动脉血流为兔后肢体隔离性灌注模型提供体外灌注速度。方法:以Doppler超声测算12只兔双股动脉平均血流速度为依据,观察不同灌注速度出现循环障碍的阳性率和时间,评价超声在该模型中应用价值。结果:以超声提供的平均血流速度灌注出现循环障碍的阳性率和时间明显低(少)于对照组。结论:

Doppler 超声测定股动脉血流速度对确定肢体隔离性灌注模型流速有指导意义,并可能为肢体恶性肿瘤隔离灌注化疗的流速提供指导。

关键词 Doppler 超声 平均血流速度 肢体隔离灌注 兔模型

Application of Doppler Ultrasound in the isolated limb perfuse model of rabbit

Wang Yongli, Li Linsun, Wang Jie, et al (Department of Radiology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing JS 210029)

Abstract Objective: Adopting Doppler ultrasound to detect the speed of femoral blood of rabbit in order to acquire the suitable speed for the isolated limb model. Methods: The probability and time of appearing extracorporeal circulation failure were observed by perfusing with variety speeds which were regulated to average speed offered by Doppler. The application value of ultrasound was estimated in this model. Results: The probability and time of appearing extracorporeal circulation failure, perfused with the average blood speed measured by Doppler ultrasound, are obviously lower and less than those of control groups. Conclusions: The average blood speed offered by Doppler ultrasound should be regarded as standard speed of the isolated limb perfuse model. This way may be the method of decision of the infusion speed in isolated limb perfuse chemotherapy of extremity malignant tumor.

Key words Doppler; Average blood speed; Isolated limb perfuse; Rabbit model

肢体隔离灌注化疗是肢体恶性肿瘤保肢治疗有效的方法,因无合适的动物实验模型以及准确的灌注速度,其基础和临床研究受到限制,因此从实验着手建立实用的动物模型,以超声测定动脉血流速度,可为基础和临床研究提供方法。

1 材料和方法

健康青紫兔 12 只,雌雄及年龄不拘,体重 2.4~3.5kg (2.88±0.31kg,由南京医科大学动物实验中心提供)。3%戊巴比妥钠(1ml/kg)经耳缘静脉推注全身麻醉,腹股沟备皮,背式固定。采用 ALT 公司 3000 型彩色多普勒声像仪,10~538mm 变频探头,斜角 60°,分别探测双侧后肢膝关节上 5~7cm 处股动脉内径(D),流量时间积分值(VTI)及动脉搏动次数(HR)。平均血流速度(V)以公式 $V=1/4 \cdot (D^2 \cdot VTI \cdot HR)$ 计算。暴露分离并穿刺股动静脉,采用小型膜式氧合器(上海复旦大学

延生生化公司制造)提供氧气交换场所;以医用氧气压力 5Mpa,流速 100ml/min 条件进行气体交换,以蠕动泵(河北正定兰格公司制 BT01-100 驱头器,YZ1515 易装型)提供隔离灌注动力并通过该装置调节体外循环灌注速度从而建立兔肢体体外隔离循环灌注模型。

不同灌注流速出现静脉引流不畅(循环障碍)的观察,根据公式由超声测算的平均参数值计算出股动脉平均血流速度作为参考值,分别以灌注速度:10ml/min(平均血流速度下限值),12ml/min(平均血流速度),17ml/min(大于平均血流速度 5ml/min)与 22ml/min(大于平均血流速度 10ml/min)灌注。观察静脉引流不畅出现的时间发生率。

2 结果

2.1 Doppler 超声测定平均参数值见表 1:

表 1 Doppler 超声平均值参数

编号	左				右			
	D(mm)	VTI(cm)	HR(bpm)	V(ml/min)	D(mm)	VTI(cm)	HR(bpm)	V(ml/min)
1	1.2	5.5	207	12.88	1.2	5.4	219	15.37
2	1.1	5.1	232	11.24	1.1	5.3	217	10.93
3	1.2	4.2	208	9.88	1.1	4.3	212	8.66
4	1.3	4.1	242	13.16	1.2	4.1	241	11.18
5	1.3	4.5	250	14.93	1.3	4.3	251	14.33
6	1.1	4.5	230	11.97	1.2	4.4	211	10.22
7	1.3	4.1	220	11.57	1.2	4.4	211	10.50
8	1.2	5.3	230	13.79	1.2	5.3	219	13.13
9	1.2	4.7	203	10.79	1.2	5.1	218	12.57
10	1.2	4.5	227	10.35	1.1	4.5	231	9.88
11	1.1	4.8	245	11.18	1.3	4.7	245	15.28
12	1.2	5.4	235	14.35	1.2	5.3	226	13.55
$\bar{x} \pm s$	1.19±0.10	4.7±0.5	226±17	12.03±1.68	1.18±0.06	4.8±0.5	228±16	11.97±1.94

总平均流速 $V=12.0 \pm 1.8$ ml/min

$$V=1/4\pi D^2 \cdot VTI \cdot HR$$

D: 血管内径

HR: 股动脉搏动次数,即心率

VTI: 流量时间积分值

V: 平均血流速度

2.2 不同灌注速度静脉引流不畅结果 全部 24 条后肢初始以 10ml/min 灌注未见静脉引流不畅;12ml/min 流速灌注 10 分钟内(5~7 分钟)有 2 只兔双侧后肢均出现静脉引流不畅,发生

率 16.7%(2/24);17ml/min 灌注 5 分钟内静脉引流不畅发生率 75%(18/24);22ml/min 灌注 3 分钟内引流不畅发生率 100%(24/24)。后两者与前两者采用 Sigma Plot Windows 软件包进

行方差分析, χ^2 检验有非常显著差异 ($P < 0.001$)。观察结果见表 2:

表 2 不同灌注速度静脉引流不畅结果

编号	10ml/min		12ml/min		17ml/min		22ml/min	
	左	右	左	右	左	右	左	右
1	-	-	-	-	+	+	+	+
2	-	-	-	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	+	+
5	-	-	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	+	+	+	+
7	-	-	-	-	+	+	+	+
8	-	-	-	-	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	+	+
10	-	-	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	+	+

发生率 0%(0/24) 16.7%(4/24) 75%(18/24) 100%(24/24)

*: 引流不畅判断标准, 静脉输出端连接管瘪陷, 体外循环停滞状态为阳性。

3 讨论

在肢体隔离灌注中首先需要解决的是灌注流速问题。当灌注速度低于或高于生理流速较多时, 产生肢体并发症程度将提高^[1], 表现为组织缺血缺氧或筋膜间压力增高, 肢体充血肿胀。国内外文献报道的肢体灌注速度(即使考虑到个体差异, 人种差异以及上下肢的不同)相差悬殊。Klaase^[2]报道为 750ml/min, 徐世伟^[3]报道为 660~1000ml/min, 孔繁锦^[5]报道为 75~300ml/min, 夏贤良报道^[4]500~1500ml/min。没有相对统一的标准范围, 亦未提供上述灌注速度的客观依据。

本实验证明, 兔肢体隔离灌注同样出现上述情况。大于平均流速的灌注可导致动脉充血, 动脉输入端血压上升; 静脉端引流不畅, 连接管瘪陷, 后种表现更为直观, 且灌注速度愈快出现机率愈大, 时间愈早。上述现象的解剖基础和机理可能与动静脉之间毛细血管床的流速和开放程度有关。大于生理流速状

态下, 毛细血管床滤过量相对于转速增加的蠕动泵的需求量而言明显不足, 因此动脉充血, 静脉出现负压抽吸(引流不畅)。徐世伟^[3]在铂剂下肢骨肉瘤灌注一文的结果中亦有报道。

超声测定血流速度临床虽有广泛应用, 但在隔离灌注化疗中作为灌注速度的依据鲜有人报道。Borel Rinke^[6]于 1997 年在肝脏灌注一文中采用于测定肝动脉及门静脉血流速度。我们受此启发, 采用 Dopple 超声测定流速。

实验结果提示 Doppler 超声测算提供的平均血流速度 10~12ml/min 更接近生理血流速度, 可以作为调节灌注速度的依据。当流速在 17 或 22ml/min 时肢体静脉引流不畅发生率甚高, 分别为 75% 和 100%, 在 12ml/min 流速时发生率仅为 16.7%, 根据超声调整在 10~12ml/min ($10\text{ml} \leq V < 12\text{ml}$) 时静脉引流不畅发生率为零。据此可认为: 参照超声平均血流速度, 灌注中适当调整的方法是唯一可行的客观标准, 可以保证灌注的正常进行。相信这一方法在今后人体肢体隔离灌注化疗中也有指导性应用价值。

参考文献

1. JMK laase, BBRK roon, ANV anGeel, et al. Systemic leakage during isolated limb perfusion for melanoma. Br J surg, 1993;80:1124~1126
2. 徐世伟, 等. 铂剂在下肢骨肉瘤区域高温隔离灌注化疗中的应用. 中国癌症研究进展, 1995;3:280~282.
3. 孔繁锦, 等. 区域灌注化学疗法治疗肢体恶性肿瘤 30 例的疗效观察. 中华骨科杂志, 1980;6(5):330~332
4. 夏贤良, 等. 下肢骨肉瘤高温隔离灌注化疗初步报告. 中华骨科杂志, 1994;14(11):47~64
5. 李成朗, 等. 动脉灌注治疗肢体恶性肿瘤(附 50 例分析). 中国影像医学杂志, 1994;2(3):155~157
6. IHM Bore Rinke, et al. Isolated hepatic perfusion in the pig with TNF with and without melphalan. Br Journal of Cancer, 1997;75(10):1447~1453.

(收稿日期: 1999-06-16)

516-517

穿心莲黄酮片治疗脑梗塞的研究*

徐州老年病研究所(221000) 韩谷鸣 张庆华 曹军杰 贺卫平 居岭 姚英杰

④
R743.330.5

摘要 选择 22 例脑梗塞患者, 口服穿心莲黄酮糖依片 1 个月, 观察治疗前后脑梗塞患者的临床疗效和血栓性指标的变化。结果表明 ① 疗效显著者 5 例占 23%, 有效 14 例, 占 64%, 总有效率 87%; ② 用药后血浆 Tx_2 , Gmp-140, PAI/TPA 水平均明显降低 (P 均 < 0.05), 血浆 ET 有一定程度降低, TPA 有一定程度升高但均不显著 (P 均 > 0.05), 血浆 6KPGF_{1 α} , PAI 水平无变化。③ 用药前后患者肝、肾功能、三大常规均无变化。揭示: 穿心莲黄酮具有较强的抗血栓、促进纤溶作用, 并可能有一定的舒张血管作用, 对脑梗塞具有良好的治疗作用。

关键词 黄酮片 脑梗塞 血小板 纤溶

15 页

穿心莲 (APN) 黄酮糖依片是本所研制的新型抗血栓药, 本课题组提取并测定黄酮含量, 研究发现黄酮在体外能够抑制血

小板活化反应, 抑制内皮细胞 ACE、ET 的生成, 促进 TPA 的分泌, 动物实验研究表明黄酮能够迅速降低血浆 Tx_2 水平和血