

# 不同时间心肺复苏脑组织损伤变化规律

司金春<sup>1</sup>, 许志杰<sup>2</sup>, 陈卫东<sup>3</sup>, 肖志强<sup>4</sup>, 司运辉<sup>1</sup>, 杨琰琪<sup>1</sup>, 郭保强<sup>1</sup>, 余洁<sup>1</sup>, 白二丽<sup>1</sup>

1. 商丘医学高等专科学校外科教研室, 河南 商丘 476000; 2. 商丘市第四人民医院神经外科, 河南 商丘 476100;  
3. 商丘市第四人民医院肾内科, 河南 商丘 476100; 4. 商丘市第一人民医院神经外一科, 河南 商丘 476000

**摘要:** **目的** 观察大鼠在心脏骤停后不同时间实施心肺复苏(CPR)脑组织的损伤程度,为临床 CPR 提供参考。**方法** 选用健康雄性 Wistar 大鼠 30 只,随机分为对照组(6 只)和实验组(24 只)。对照组不予窒息和心肺复苏;实验组按复苏时间分为甲、乙、丙、丁四个亚组(每组 6 只),均以 2% KCl 快速静脉注射诱发心脏骤停,并分别于呼吸停止后 2、4、6、8 min 实施 CPR。6 h 后处死全部大鼠,取脑组织做切片,显微镜下观察海马区神经元的变化并统计存活神经元数目。应用考马斯亮蓝法(Bradford)检测血红素氧合酶 1(HO-1)蛋白及转录因子核因子 E2(NF-E2)相关因子 2(Nrf2)核蛋白相对表达量。采用干湿重法计算脑组织含水量。**结果** 复苏后,实验组均见海马区神经元有明显的损伤,神经元存活数量显著减少,其中丙组(22.33 ± 5.92)个、丁组(20.00 ± 5.53)个与对照组(47.44 ± 5.76)个,甲组(28.00 ± 5.01)个、乙组(29.03 ± 5.03)个比较,存活神经元数量均明显降低,差异有统计学意义( $P$  均 < 0.05)。对照组 Nrf2 核蛋白、HO-1 蛋白均呈低表达,与对照组比较,甲乙丙丁各组 Nrf2 核蛋白、HO-1 蛋白相对表达量均有升高,其中丁组又明显高于其余各组( $P$  < 0.05,  $P$  < 0.01)。与对照组比较,各实验组脑组织含水量均明显增加( $P$  均 < 0.05),其中丙、丁组较甲、乙组脑组织含水量明显增加( $P$  均 < 0.05),而甲、乙组之间及丙、丁组之间比较均无明显差异( $P$  均 > 0.05)。**结论** 在心脏骤停后,及时有效的 CPR 能改善脑缺血,从而减轻脑水肿,有助于改善预后。

**关键词:** 心脏骤停; 心肺复苏; 脑缺血损伤; 血红素氧合酶 1; 转录因子核因子 E2 相关因子 2

**中图分类号:** R 541.7<sup>+</sup>8 R 651.1<sup>+</sup>5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)05-0586-04

## Difference of brain tissue damage after cardiopulmonary resuscitation in different time in rats

SI Jin-chun\*, XU Zhi-jie, CHEN Wei-dong, XIAO Zhi-qiang, SI Yun-hui,

YANG Yan-qi, GUO Bao-qiang, YU Jie, BAI Er-li

\* Surgery teaching and research section, Shangqiu medical college, Shangqiu, Henan 476000, China

Corresponding author: XU Zhi-jie, E-mail: 1033649583@qq.com

**Abstract: Objective** To observe the degrees of brain tissue damage of cardiopulmonary resuscitation (CPR) in different time after cardiac arrest in rats to provide a guidance for clinically performing CPR. **Methods** Thirty healthy male Wistar rats were selected and were randomly divided into control group ( $n = 6$ ) and experiment group ( $n = 24$ ). The asphyxia and CPR were all not performed in control group. The experiment group was re-divided into subgroups A, B, C and D ( $n = 6$  each) according to the beginning time of CPR which was respectively performed at 2-, 4-, 6- and 8-min after stopping breath following cardiac arrest induced by intravenously injecting 2% KCl. All rats were killed after 6 hours, and the brain tissue slices were made. The changes of hippocampus neurons were observed under microscope, and the survival number of neurons were calculated. The relative expressions quantities of heme oxygenase 1 (HO-1) protein and transcription factor nuclear factor -E2 (NF-E2)- related factor (Nrf2) nucleoprotein were detected by Bradford method. The content of water in brain tissues was calculated by wet weight method. **Results** Compared with control group, there were obvious damages of hippocampus neurons and the decrease of survival neurons number after CPR in experiment group, in which the survival neurons numbers in groups C (22.33 ± 5.92) and D (20.00 ± 5.53) significantly decreased compared with control group (47.44 ± 5.76), groups A (28.00 ± 5.01) and B (29.03 ± 5.03) (all  $P < 0.05$ ). Both the Nrf2 nucleoprotein and HO-1 protein presented low-expressions in control group, and their relative expression quantities in groups A, B, C and D were

significantly higher than that in control group (all  $P < 0.05$ ), while they in group D was significantly higher than those of the rest of the subgroup ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The percent contents of water in brain tissues in groups A, B, C and D were significantly higher than that in control group (all  $P < 0.05$ ) and in groups C and D were significantly higher than those in groups A and B (all  $P < 0.05$ ) while were similar in both A and B or both C and D (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** After cardiac arrest, timely and effective CPR can improve cerebral ischemia, relieve cerebral edema, thereby improve the prognosis.

**Key words:** Cardiac arrest; Cardiopulmonary resuscitation; Cerebral ischemic damage; Heme oxygenase 1; Transcription factor nuclear factor E2-related factor 2

心脏骤停(CA)是临床上常见的一种急危重症。2008年,美国心脏病协会做了一项调查,结果显示:美国院外心跳骤停患者约有166 200名,其中40 000名患者经过心肺复苏(CPR)抢救后,进入ICU接受进一步详细的治疗,但是超过50%的患者遗留严重的神经系统疾病<sup>[1]</sup>。2008年我国阜外医院做了一项国家“十一五”课题研究,结果表明:我国每年约有54.4万人出现心源性“猝死”,并采取CPR进行抢救<sup>[2]</sup>。CA可使全身各组织器官出现缺血缺氧,虽然及时有效的CPR可使大多数心脏骤停患者恢复心搏,但仍有部分出现全脑的损伤。CPR不仅仅是恢复患者的自主血液循环<sup>[3]</sup>,其最终目的是保护或尽可能恢复完整的大脑功能,快速而有效地CPR是脑复苏的前提,脑复苏已经成为现代CPR的早期靶点。本实验主要是研究CA后,进行不同时间的CPR,观察脑组织的损伤程度,从而确定最佳CPR时机。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物和分组 30只健康雄性Wistar大鼠,体重( $331 \pm 20$ )g,随机分为对照组(6只)和实验组(24只)。对照组:不给于窒息和CPR;实验组:24只大鼠随机分为甲、乙、丙、丁四亚组,每组6只。

1.2 方法 大鼠在实验开始前禁食12h,但不禁水。用注射器吸取戊巴比妥钠40 mg/kg大鼠腹腔注射,麻醉后将大鼠仰卧放置并固定于操作台上,分离大鼠颈外静脉,将聚乙烯导管(PE50)的一端植入大鼠颈外静脉,另一端和输液管道连接,输液管道用于输液给药。操作者直视下用喉镜经口插入气管导管(16G),用于连接小动物呼吸机(HX-300S)进行机械通气<sup>[4]</sup>,调节呼吸机,使各项呼吸参数维持在RR 80次/min,潮气量6 ml/kg,并使PETCO<sub>2</sub>维持在30~45 mm Hg。大鼠通气8 min后,以2% KCl按0.22 ml/100 g快速注入实验组大鼠颈外静脉,大鼠出现心跳停止,稍后呼吸消失。呼吸消失后的第2、4、6、8 min分别依次对实验组中甲、乙、丙、丁四组大鼠进行CPR,具体操作如下:行人工胸外心脏按压,频率160次/min,机械通气潮气量6 ml/kg,频率

80次/min,并迅速将肾上腺素0.02 mg/kg和5%碳酸氢钠1 mmol/kg经由输液管道快速注入大鼠静脉内。自主循环恢复(ROSC)的标志是出现自主心律,平均动脉压(MAP) > 50 mm Hg(1 mm Hg = 0.133 kPa)且持续时间为10 min,若抢救15 min后仍无效,可对大鼠放弃CPR<sup>[5]</sup>。

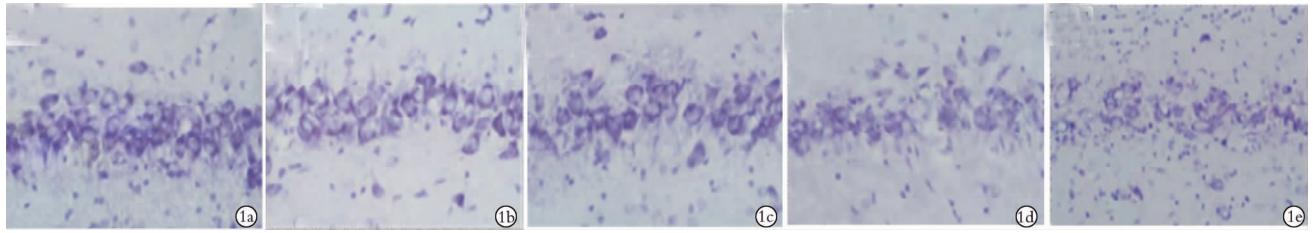
1.3 组织形态学检查 6h后将所有动物处死,取部分脑组织浸泡于10%甲醛溶液进行固定,后用Nissl染色,将冠状冰冻的脑组织放置于Leica恒冷切片机上<sup>[5]</sup>,连续切片7~8张,厚度为4 μm。将Olympus30显微镜调至明视野,切片放置载物台上,在显微镜下观察大鼠海马CA1区神经元的变化,每只大鼠分别取4张切片,统计存活神经元数目,计算各组的平均值。

1.4 转录因子核因子(NF-E2)相关因子2(Nrf2)细胞核蛋白和血红素氧合酶-1(HO-1)蛋白表达的检测

使用超速离心法检测Nrf2细胞核蛋白和HO-1蛋白表达含量,根据其在液体介质中或者沉降速度不同而形成不同的区带,或者它们的密度不同而停留在液体介质中不同的位置而把它们一一分开。取左侧一半的中脑黑质组织,用研钵在液氮冷冻条件下将样品研成粉末,每1 g样品加入0.5 ml裂解液,使用组织匀浆器匀浆30 s;组织液悬浮15 ℃,10 000 × g离心10 min;取上清液保持在4 ℃,150 000 × g超速离心45 min;避开上层漂浮的脂质层,吸取离心上清保持在6 ℃,40 000 × g再次离心50 min,取离心上清。分装后置-75 ℃保存。使用考马斯亮蓝法(Bradford)检测其相对表达量。

1.5 脑组织含水量测定 采用干湿重法检测,将各组的大鼠处死后,断头,切开头颅,取左右半脑用电子天平准确称其湿重,放置在100 ℃的烤箱里烘烤24 h<sup>[6]</sup>,烘干至重量不再变化后用电子天平称其干重。脑组织含水量(%) = (湿重 - 干重)/湿重 × 100%。

1.6 统计学处理 采用SPSS19.0统计软件分析处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用SNK检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



注:1a:对照组;1b:甲组;1c:乙组;1d:丙组;1e:丁组。

图 1 5 组大鼠海马 CA1 区神经元的形态变化(Nissl 染色,  $\times 400$ )

表 1 5 组大鼠海马 CA1 区存活神经元数目的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	存活神经元(个)
对照组	6	47.44 $\pm$ 5.76
甲组	4	28.00 $\pm$ 5.01 <sup>a</sup>
乙组	4	29.03 $\pm$ 5.03 <sup>a</sup>
丙组	4	22.33 $\pm$ 5.92 <sup>abc</sup>
丁组	4	20.00 $\pm$ 5.53 <sup>abc</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与甲组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与乙组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

表 2 脑缺血对大鼠左侧中脑黑质 Nrf2 细胞核蛋白、HO-1 蛋白相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	Nrf2/Lamin	HO-1/GAPDH
对照组	6	0.024 $\pm$ 0.026	0.193 $\pm$ 0.0241
甲组	4	0.159 $\pm$ 0.018 <sup>ab</sup>	0.607 $\pm$ 0.051 <sup>ab</sup>
乙组	4	0.164 $\pm$ 0.0172 <sup>ab</sup>	0.621 $\pm$ 0.054 <sup>ab</sup>
丙组	4	0.200 $\pm$ 0.0162 <sup>ab</sup>	0.624 $\pm$ 0.055 <sup>ab</sup>
丁组	4	0.205 $\pm$ 0.0122 <sup>c</sup>	0.963 $\pm$ 0.0162 <sup>c</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ;与丁组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

## 2 结果

**2.1 组织形态学观察** 实验组大鼠成功复苏总数为 16 只,复苏后,相对于对照组,甲组、乙组、丙组和丁组各组均可见海马区神经元有明显的损伤,神经元存活数量显著减少(图 1),但丙组、丁组与对照组、甲组和乙组比较,存活神经元数量明显降低( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 1。

**2.2 Nrf2 细胞核蛋白、HO-1 蛋白表达检测** 对照组 Nrf2 细胞核蛋白,HO-1 蛋白呈低表达,与对照组比较,甲乙丙丁各组 Nrf2 细胞核蛋白、HO-1 蛋白相对表达量均有显著升高( $P$  均  $< 0.05$ ),与其余各组比较,丁组 Nrf2 细胞核蛋白、HO-1 蛋白相对表达量,尤其是 HO-1 蛋白的相对表达量明显升高( $P < 0.01$ )。见表 2。

**2.3 脑组织含水量改变** 对照组和各实验组脑组织百分率水含量分别是 (74.2  $\pm$  2.73)%、(76.4  $\pm$  2.84)%、(76.1  $\pm$  2.72)%、(81.6  $\pm$  1.96)%、(80.7  $\pm$  2.96)% ,与对照组相比,实验各组脑组织含水量均增加( $P$  均  $< 0.05$ );丙、丁两组脑组织含水量

比甲、乙两组明显增加( $P$  均  $< 0.05$ ),而甲、乙两组及丙、丁之间差异无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ )。

## 3 讨论

CA 是一种突发性疾病,大多是无法预知的,而 CA 之后迅速及时的 CPR 及后期治疗是抢救生命的关键。查阅大量资料,发现目前国内外在此方面虽有较多研究,但均是采取对临床资料进行回顾性分析的角度且研究方法缺乏标准化。因此,本研究在考虑到研究课题所需取材受到临床和医学伦理限制的基础上,选取大鼠建立标准 CPR 模型,将实验结果和临床 CPR 后脑损伤患者的相应症状进行对比分析。本实验在预实验及查阅文献的基础上使用 2% KCl 致大鼠出现 CA,分别在 2、4、6、8 min 后给予 CPR,通过观察不同指标的变化,来探究 CPR 的最佳时间。

很多研究结果表明,海马 CA1 区的神经元对缺血、缺氧极为敏感,并且也是最容易受到损伤的神经元<sup>[7]</sup>。本实验中海马 CA1 区神经元除对照组外,各实验组均有一定的损伤,与对照组、甲组和乙组比较,丙组、丁组存活神经元数量降低更加明显,但甲组和乙组无明显差别。

Nrf2 是缺血、缺氧的敏感感受器,在参与细胞抗氧化应激机制中发挥重要的作用<sup>[8]</sup>。HO-1 可以降低组织对氧化应激刺激的敏感性,从而减少细胞的损伤。研究表明 Nrf2 是 HO-1 重要的上游调控基因,因此 HO-1 的表达和 Nrf2 的表达具有一致性,即 Nrf2 的表达升高时,HO-1 的表达含量也会发生相应的上升<sup>[9-11]</sup>。本实验中,各实验组与对照组相比,Nrf2 和 HO-1 均升高,丁组最为突出。大鼠出现 CA 后,大脑在接受缺血缺氧的刺激后,启动抗氧化应激机制,使二者表达水平增高,在及时实施 CPR 后,大脑缺血缺氧症状有所改善,二者的表达又略降低,所以甲乙两组较丙丁两组降低,但仍高于对照组的表达水平。

在脑缺血早期,进行 CPR 有助于改善脑缺血,有利于脑细胞代谢,阻断缺氧与水肿之间的恶性循环,从而减轻脑水肿。本实验中丙丁两组的脑含水量较

其余各组略高,而这两组之间的差异无统计学意义,表明及时有效的 CPR 有利于减轻脑组织的水肿。

综上所述,CA 会导致脑局部供血障碍,出现相应脑供血区的局灶性缺血及短暂性的神经功能缺失,从而出现一系列相应的症状。及时有效的 CPR 可以明显改变 CA 所致的脑组织损伤,有利于缓解患者的症状,但是本实验还有一些不足之处,一些测量结果显示甲组并不总是优于乙组,这种现象可能是由误差造成的,或是适当延后实施 CPR 的时间对全脑损伤可以产生更好的保护效果,尚需进一步的研究。

#### 参考文献

[1] Jia X, Koenig MA, Venkatraman A, et al. Post-cardiac arrest temperature manipulation alters early EEG bursting in rats [J]. *Resuscitation*, 2008, 78(3): 367 - 373.

[2] 胡大一. 推动 AED 任重而道远 [J]. *临床心电学杂志*, 2008, 17(4): 244 - 245.

[3] Ikeda Y, Long DM. Effect of Arachidonate lipoxigenase inhibitor BW755C on traumatic and peritumoural oedema [J]. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, 1990, 51: 68 - 70.

[4] 赵贝贝, 郑春叶, 雒晓东, 等. 帕病 2 号方对帕金森病模型大鼠中脑黑质 Nrf2, HO-1 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(8): 158 - 162.

[5] Kannan RP, Hensley LL, Evers LE, et al. Hepatitis C virus infection

causes cell cycle arrest at the level of initiation of mitosis [J]. *J Virol*, 2011, 85(16): 7989 - 8001.

- [6] Wang H, Ye Y, Chui JH, et al. Oridonin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through MAPK and p53 signaling pathways in HepG-2 cells [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(3): 647 - 651.
- [7] 杨璐, 赵晓勇, 孙美艳, 等. CREB 磷酸化蛋白水平对  $\delta$  阿片受体激动剂后处理脑保护作用的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29(5): 484 - 487.
- [8] Wang L, Jiang H, Yin Z, et al. Methylmercury toxicity and Nrf2-dependent detoxification in astrocytes [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 107(1): 135 - 143.
- [9] Kim JW, Li MH, Jang JH, et al. 15-Deoxy-Delta (12,14)-prostaglandin J (2) rescues PC12 cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis through Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1: potential roles of Akt and ERK1/2 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(11): 1577 - 1589.
- [10] Hwang YP, Jeong HG. Ginsenoside Rb1 protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing heme oxygenase-1 expression through an estrogen receptor-related PI3K/Akt/Nrf2-dependent pathway in human dopaminergic cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 242(1): 18 - 28.
- [11] Ge ZD, Pravdic D, Bienengraeber M, et al. Isoflurane postconditioning protects reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition by an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism [J]. *Anesthesiology*, 2012, 112(1): 73 - 85.

收稿日期: 2016-01-12 修回日期: 2016-02-01 编辑: 周永彬

(上接第 585 页)

[10] Greene FL, Sobin LH. A worldwide approach to the TNM staging system: collaborative efforts of the AJCC and UICC [J]. *J Surg Oncol*, 2009, 99(5): 269 - 272.

[11] Akkoca AN, Yanik S, Ozdemir ZT, et al. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(9): 2828 - 2835.

[12] Yoon YS, Keum N, Zhang X, et al. Circulating levels of IGF-I, IGFBP-3, and IGF-I/IGFBP-3 molar ratio and colorectal adenomas: A meta-analysis [J]. *Cancer Epidemiol*, 2015, 39(6): 1026 - 1035.

[13] Mirdamadi Y, Thielitz A, Wiede A, et al. Insulin and insulin-like growth factor-1 can modulate the phosphoinositide-3-kinase/Akt/FoxO1 pathway in SZ95 sebocytes in vitro [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 415: 32 - 44.

[14] 张军, 吴毅平. 结肠癌患者血清 IGF-I 水平及癌组织 VEGF 表达

的临床意义 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2006, 35(2): 221 - 223.

- [15] 赵雪峰, 李勇, 范立侨, 等. 胃癌及其区域淋巴结中 PTEN、IGF-I/IGF-IR mRNA 的表达 [J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27(8): 736 - 738.
- [16] 赵雪峰, 焦志凯, 李勇, 等. 胃癌中 PTEN、IGF-I、IGF-IR 蛋白表达及其预后意义评价 [J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(12): 1197 - 1199.
- [17] 殷志韬. 结肠癌患者肿瘤组织中 VEGF-C、血清 IGF-I 水平检测及临床意义 [J]. *山东医药*, 2011, 51(23): 101 - 102.
- [18] 田小平, 李玉, 李燕, 等. 乳腺癌患者血清 VEGF 和 IGF-I 联合检测的临床意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(10): 1702 - 1704.

收稿日期: 2015-12-16 修回日期: 2016-02-12 编辑: 王国品