分类号 密 级 学校代码 **10367**

U D C 编 号 学 号 **20127731225**

**Kappa 阿片受体激动剂 salvinorin** A **对深低温停循环术后脑损伤保护作用的研究**

**The neuroprotection research of kappa opioid receptor agonist salvinorin A on the cerebral injury induced by deep hypothermia circularoty arrest**

**论文类别：学术研究型**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **作** 者 姓 名 | **陈煜** | **指导教师姓名** | **梁启胜 王祥瑞** |
| **申请学位级别** | **硕** 士 | **学位授予单位** | **蚌埠医学院** |
| **学** 科 专 业 | **麻醉学** | **研 究 方** 向 | **围术期脏器**  **功能保护** |
| **论文答辩时间** | **2015 年 05 月** | **学位授予日期** | **2015 年 06 月** |

**答辩委员会主席： 论 文 评 阅 人：**

**2015年5月**



**硕 士 学 位 论 文**

**论** 文 题 目：

**Kappa 阿片受体激动剂 salvinorin** A **对深低温停循环术后脑损伤保护作用的研究**

**The neuroprotection research of kappa opioid receptor agonist salvinorin A on the cerebral injury induced by deep hypothermia circularoty arrest**

**研 究 生 姓 名:** **陈煜**

**指** 导 教 师**:** **梁启胜 王祥瑞**

**学**科专业**:麻醉学**

**研**究方向**:围术期脏器功能保护**

**论文工作时间:** **2013年5月至2015年3 月**

学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。本论文中除引文外，所有实验、数据和有关材料均是真实的。本论文中除引文和致谢的内容外，不包含其他人或其它机构已经发表或撰写过的研究成果。其他同志对本研究所做的贡献均已在论文中作了声明并表示了谢意。

学位论文作者签名：日期：

学位论文使用授权声明

研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属蚌埠医学院。学校有权保存本学位论文的电子和纸质文档，可以借阅或上网公布本学位论文的部分或全部内容，可以采用影印、复印等手段保存、汇编本学位论文。学校可以向国家有关机关或机构送交论文的电子和纸质文档，允许论文被查阅和借阅。（保密论文在解密后遵守此规定）

保密论文注释：本学位论文属于保密论文，密级： 保密期限为年。

学位论文作者签名：导师签名：

日期：日期：

目 录

[中文摘要](#_Toc686150305) 4

[Abstract](#_Toc686150306) 4

[前 言](#_Toc686150307) 4

[1.实验材料](#_Toc686150308) 5

[2.实验分组](#_Toc686150309) 5

[3.实验方法](#_Toc686150310) 5

[4.统计方法](#_Toc686150311) 6

[5. 结果](#_Toc686150312) 6

[参考文献](#_Toc686150313) 12

[讨论](#_Toc686150314) 15

[结 论](#_Toc686150315) 16

[参考文献](#_Toc686150316) 16

[附 录](#_Toc686150317) 17

[参考文献](#_Toc686150318) 17

**Kappa 阿片受体激动剂salvinorin A对深低温停循环术后脑**

**损伤保护作用的研究**

# 中文摘要

目的：本实验使用大鼠深低温停循环模型，以Kappa阿片受体激动剂salvinorin A

进行预处理，来研究salvinorina A的脑保护效应。

方法：动物实验，采用雄性SD大鼠，应用小动物专用膜式氧合器，采用尾动脉灌注，右侧颈静脉插管至右心房引流静脉血液的方式建立闭胸式体外循环，将大鼠体温降至16--18℃，停止全身血液循环40min，再将大鼠体温恢复到33℃，即为深低温停循环，随机分为三组，Control组：正常大鼠，不做任何处理，作为空白对照组；深低温停循环组：大鼠单纯进行深低温停循环40 min处理；深低温停循环+salvinorin A预处理组：对大鼠进行salvinorin A 10 ug预处理，再进行深低温停循环40 min。术后48小时大鼠进行Morris水迷宫检测，以此评估大鼠的学习与记忆功能。

结果：成功建立了大鼠深低温停循环模型，水迷宫检测结果发现，单纯深低温停循环组大鼠确实存在术后的神经损伤，而在使用了Kappa受体激动剂salvinorina A预处理后，与单纯深低温停循环组的大鼠相比较，神经功能得到改善。

结论：深低温停循环可以引起术后神经功能损伤，而对大鼠进行Kappa受体激动剂salvinorin A预处理后，能够改善大鼠术后神经功能。

关键词：深低温停循环； 脑损伤； salvinorina A

The neuroprotection research of kappa receptor stimulate salvinorin A on the cerebral injury induced by the deep hypothermic circulatory arrest (DHCA)

Abstract

Objective To establish a DHCA rat model and research the neuroprotection of kappa receptor stimulate salvinorin A induced by the model.

Methods We introduce a new Sprague-Dawley(SD) rat model using the animal oxygenator. SD rats were perfused via its tail artery and drainaged

Through the right jugular vein cannulation to establish a closed chest rat model. When the body temperature reduced to 16--18℃, we paused the body blood circulation for 40 min, then rewarmed the temperature to 33℃. We divide the eighteen rats into three groups randomly, one group is control group, another group is DHCA group, the third one is

DHCA+salvinorin A group. We examine behavior study through Morris water maze after 48 hours, evaluating the study and memorial ability.

Results Through the water maze results, the DHCA group rats appear cerebral injury. At the same time, the DHCA+salvinorin A group rats appear better behavior study than the DHCA group.

Conclusion DHCA acute have a connection with cerebral injury. Pretreating with salvinorin A before DHCA model, the neurological complacations can release.

KEy words deep: deephypothermiacircularotyarrest; Braininjury; Salvinorin A

第一部分大鼠深低温停循环模型的建立

前 言

体外循环技术自上个世纪50年代开始应用于临床[1]，大大推动了心血管手术的发展，现在已经成为心血管手术不可缺少的手段。深低温停循环（DHCA）技术则为某些复杂性的先心病，大血管手术和复杂脑动脉瘤等无法在单纯体外循环下完成的手术提供了可能。DHCA技术是指在体外循环的帮助下，将病人的体温降低到18℃左右，然后停止包括体外循环在内的所有循环，这样在低温的保护下，可以实现手术野完全无血，从而实现单纯体外循环下不能完成的手术。然而，研究表明即使在临床公认的停循环安全时限（40 min）内，手术后仍出现各种并发症，尤其是神经系统并发症[2]。Jonas [3]发现深低温手术后的病人近期出现手足徐动、短暂惊厥；远期发生认知功能障碍，儿童甚至会出现智力发育迟滞。而这些神经并发症目前还没有很好的预防和治疗的方法，其中一个最主要的原因就是没有合适的动物模型。各种临床前研究都需要能够在动物模型上证明，然后才能进行临床实验。早些年关于DHCA动物模型的研究大多数仍采用猪、犬、羊[4、5、6]等大型动物，虽然这些大型动物能够很好地模拟临床，有较高的研究价值，但是耗费大量的人力，往往需要多学科研究者共同参与，除此之外，大动物费用高昂，对手术环境要求很高，并且术中的管理很困难，再者，术后的存活率比较低。在这种情况下，大鼠作为实验研究对象进入了研究者的视线，并逐渐成为研究的热点。大鼠的心血管系统与人体的解剖相近[7]，并且来源广泛、价格便宜，围术期管理方便，而且大鼠长期作为各项实验研究的对象，样本采集方便，检测项目繁多，并且有较为公认的检测标准。选用大鼠作为研究对象，还有如下优势：1、大鼠大脑有完整的Wills血管环，与人类大脑的脑血供相似，适合用于DHCA术后因脑血流的改变而引起神经系统损伤的研究[8]；2、大鼠左侧和右侧各有一条上腔静脉，结扎一侧上腔静脉，不影响大鼠的存活[9]。因此，以大鼠为研究对象的动物模型经济、简便，并且能够模拟临床，在DHCA动物模型的研究中有着重要的意义。

随着外科技术和实验动物装置的发展，大鼠DHCA再次受到研究者的关注，如何将动物模型设计地更加能够模拟临床，更加合理实用，预充量小并且转流量更加符合生理状态，能为DHCA术后神经系统的研究提供更好的平台成为研究热点。本实验拟应用大鼠作为实验动物，构建接近临床环境的大鼠DHCA模型。

##### 材料与方法

## 1.实验材料

### 1.1 实验试剂与材料

异氟醚：鲁南贝特制药有限公司

6%羟乙基淀粉：北京费森尢斯卡比医药有限公司

0.9％NaCl溶液：浙江天瑞药业有限公司碳酸氢钠溶液：江西东业制药有限公司

肝素钠注射液：上海第一生化药业制品有限公司枸橼酸芬太尼注射液：人福医药有限公司

顺式阿曲库铵：江苏恒瑞医药股份有限公司氧气：上海南汇化工轻工有限公司

静脉留置针（14G, 22G）：浙江康德莱医疗器械股份有限公司手术器械：上海医疗器械有限公司

### 1.2 主要实验仪器

异氟醚麻醉挥发罐：德国Drager公司

动物恒温系统：上海奥尔科特生物科技有限公司血气分析仪：美国Rapidlab 860公司

小动物呼吸机：美国Kent科技有限公司

恒流蠕动泵：美国Cole-Parmer设备有限公司多导生理监测仪：德国惠普有限公司

实验用膜式氧合器（人工肺）：德国Martin公司水箱：上海豫康仪器设备公司

离心机：美国BECKMAN公司

PE10导管：公司

### 1.3 实验动物

本实验采用成年健康雄性SD大鼠（购自上海西普尔－毕凯公司），体重

400--450 g，14w—16w。

## 2.实验分组

SD大鼠12只，按照随机分组原则，分为两组，每组6只（n=6），分别为：

control组（6只）：空白对照组，不做处理；

DHCA组（6只）：异氟醚吸入麻醉，深低温停循环40 min组。

各组手术操作及监测过程共需4小时（体外循环转流前外科手术操作1小时，降温20分钟，停止循环40分钟，复温45分钟，停止体外循环后呼吸机维持并监测生命体征1小时）。

## 3.实验方法

### 3.1 麻醉方法

大鼠术前禁食12h，但可自由摄水。将大鼠放入挥发罐中，拧紧罐盖，以浓度为4%的异氟醚进行麻醉诱导，成功诱导后用呼吸面罩维持麻醉，将大鼠固定于手术台上，用透光法经口进行气管插管（14G套管针），固定插管，接小动物呼吸机进行机械通气，压力控制模式，呼吸频率为60次/分钟，潮气量为8 ml/kg，维持大鼠PCO2 35-40 mm Hg。外科操作期间，以1.5%--2%的异氟醚进行麻醉维持。将肛温探头放入直肠，进行体温监测，根据体温情况酌情给大鼠使用保暖措施，如加盖毛巾或者使用动物用电加热毯，维持大鼠体温34±0.5℃。

### 3.2 CPB术前准备

3.2.1体外循环设备建立及预充

整体的回流通路是由中心静脉回流管（内径5F）、静脉贮血槽、硅胶管、蠕动泵（美国Cole-Parmer设备有限公司）、动物实验专用膜式氧合器（预充量为

4mL，气体交换面积558cm2）等组成。该动物氧合器的外壳是两块普列克斯有机玻璃板（12.8 cm×12.8 cm×2.7 cm）组成，内夹一层气血交换膜（Jostra AG,

Hirrlingen, Germany），膜是由三层中空的聚丙烯纤维交叉黏合而成来提高氧合功能。这种动物专用膜式氧合器预充量小并且氧合效能高。体外循环转机时贮血槽位于心脏平面以下15cm，便于右侧颈静脉回流血液，连接泵管（泵管内径为1.6mm）一端连接贮血槽，经过恒流蠕动泵（转速10-600rpm，泵头流速为

4.8-480ml/min）后与人工膜肺静脉端相连。膜肺的进气口与氧气管相连，通过外走血，内走气的方式进行气体交换，废气由废气口排出，进行气体交换后的血经膜肺动脉端的泵管流出，由三通与大鼠尾动脉置管处相接通，作为动脉灌注端。装置连接好后用6%羟乙基淀粉进行管道预充，预充时排净管道中的气泡。整体CPB管道仅需10 mL预充液体（6%羟乙基淀粉、200 IU肝素、芬太尼20 ug及顺阿曲库铵5mg），能够很大程度上减少在体外循环时的血液稀释，使无血预充得以实现。

3.2.2大鼠CPB前手术

仔细分离大鼠的左侧腹壁浅动脉，置双线，以PE10导管进行穿刺置管，将导管固定好，连接延长管后再与多导生理监测仪相连接，进行动脉血压监测，插入肛温探头持续进行肛温监测。在大鼠尾部近心端正中线处做切口，仔细分离出尾动脉，置双线，用22G静脉套管针穿刺置管，固定好穿刺针，留做灌注端待用；在大鼠尾部中段处做切口，分离出尾静脉，置双线，用PE 10导管置管，固定好导管，为术中给药待用。在大鼠颈部正中线右侧约0.5 cm处剪开皮肤，钝性分离组织，暴露出颈静脉后分别在静脉远心端及近心端处置线，将远心端结扎，以精细剪在颈静脉远心端处剪一小口，用末端多孔的5 F静脉导管沿小口置入，将导管缓慢推入右心房后妥善固定，连接延长管至静脉贮血槽内，作为静脉血液的流出端，回流依靠重力以及虹吸作用，位置低于大鼠心脏平面15 cm。然后大

鼠全身进行肝素化，肝素用量为200 IU。

### 3.3 体外循环转流

颈静脉穿刺成功后开始CPB转流，转流的流量从50 ml/(kg·min)开始，视静脉回流情况酌情升高到100 -- 120 ml/(kg·min)，约为大鼠心排量的60-80%

（160-180 ml/(kg·min))[10]。转流稳定后即可开始降温，在水箱内加入冰水混

合物，保持水箱温度在0℃--4℃，体表及头部采用冰袋降温。降温期间停止机械通气，异氟醚用量调整为0.5%维持，氧流量调整到0.2--0.5 L/min。当大鼠体温降至18℃时，停止降温，降温时间控制在20 min左右，降温结束后停止体外循环转流，将CPB通路改为短路进行转流。大鼠颈静脉回流端开放，将心脏内血液放空至贮血槽内。DHCA组停止循环40 min，停循环期间继续用冰袋维持低体温在16--18℃。停循环期结束后，开始复温阶段，将水箱内水温升高，保持水温高于血温10℃以内，大鼠体表使用电热毯及热水袋进行升温，将体温升至

33℃，时间控制在45 min左右。复温初期在体外循环中加入0.4ml碳酸氢钠，其后的复温过程根据血气结果使用适当碳酸氢钠纠正酸中毒，至体温恢复到

33℃以上并且生命体征平稳后脱离体外循环转机，恢复机械通气，根据体温的情况酌情使用热水袋覆盖体表，并辅以加热灯进行体温维持，呼吸机机械通气1 h监测大鼠生命体征，回收CPB通路中的血液，离心（2000 rpm,10分钟, 4℃）后弃上清，将红细胞回输入大鼠体内。观察期结束后，停止吸入麻醉，待大鼠完全清醒，呼吸功能及神经反射完全恢复后，拔除气管插管、穿刺针及导管，仔细结扎伤口，取出肛温探头，把大鼠放入观察箱内，低流量给氧，加热灯供温，供水，观察三个小时后进行单笼饲养。

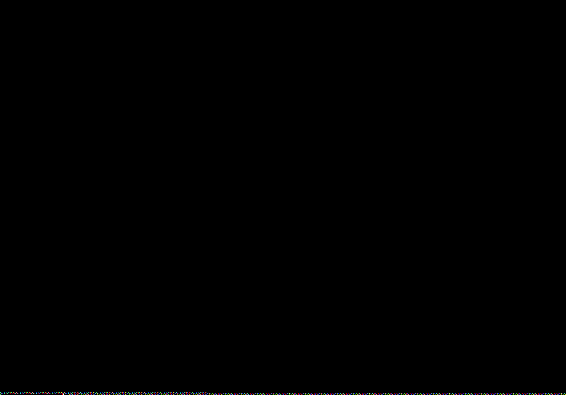


图1 大鼠体外循环模型示意图

### 3.4 体外循环监测指标

分别于降温前、降温10 min、DHCA期、复温10 min、复温20 min、复温结束期以及脱机前进行血气分析结果数据采集及生命体征的数据采集。Control组大鼠于相应时间点采集动脉血气样本进行检测并且对生命体征数值进行纪录。

## 4.统计方法

应用SPSS 10.0软件分析数据，数据采用均数±标准差表示。各时间点的数据用重复测量数据方差分析方法，P<0.05认为有显著性。具体数据采集结果见下图表1及表2。

## 5. 结果

实验过程中DHCA组2只大鼠在复温过程中死亡，3只大鼠在苏醒后死亡。其余大鼠均进行正常转流并存活。

表1

不同时间点大鼠Th命体征及血气分析

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 降温前 降温 10min DHCA |
| 心率体温血压PH PCO2 PO2  Hb K+  Na+ Ca+ Glu Lac  Hct | con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组 |  | 293+2 289+3 288+3  289+7 61+5\* 0\*  33.2+0.3 32.3+0.4 31.4+0.2  32.9+0.1 21.5+0.9\* 17+0.3\*  83.1+1.5 74.7+2.1 72.5+2.9  80.6+2.8 51.3+2.4\* 0\*  7.44+0.02 7.40+0.01 7.41+0.01  7.41+0.01 7.34+0.03 0\*  43+2 41+1 42+1  40+2 39+3 0\*  281+3 278+2 278+1  273+6 269+4 0\*  11.7+0.3 10.7+0.2 10.6+0.2  11.8+0.2 5.8+0.2\* 0\*  4.1+0.1 3.8+0.1 4.0+0.1  4.0+0.1 3.6+0.1 0\*  138+1 139+1 141+1  140+2 141+2 0\*  1.2+0.03 1.02+0.06 1.08+0.04  1.15+0.06 0.79+0.05\* 0\*  9.8+0.4 10.5+0.3 10.4+0.3  9.9+0.5 9.9+0.7 0\*  1.2+0.1 1.8+0.2 1.8+0.1  1.1+0.2 1.7+0.3 0\*  38+1 37+1 37+1 |
|  | DHCA 组 |  | 36+1 19+1\* 0\* |

表1 各组间参数的比较，\*表示p<0.05

表 2 不同时间点大鼠Th命体征及血气分析

|  | | 复温 10min | 复温 20min | 复温结束 | 停止通气 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 心率体温血压PH PCO2 PO2  Hb K+  Na+ Ca+ Glu Lac  Hct | con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组  DHCA 组  con 组 | 277+3  188+17\*  31.2+0.1  24.4+0.7\*  71.7+2.5  52+1.7\*  7.39+0.01  7.39+0.01  41+1  42+2  276+2  275+3  10.4+0.2  5.7+0.2\*  4.3+0.3  4.1+0.1  140+1  142+1  1.04+0.04  0.89+0.06  9.7+0.4  10.6+0.6  1.7+0.1  4.4+0.2\*  36+1 | 245+9  265+18  31+0.1  30.8+0.5  72+9  72.8+3.8  7.41+0.02  7.42+0.02  37+2  37+2  277+2  275+3  10.5+0.3  6.4+0.2\*  4.2+0.2  3.9+0.1  141+1  142+1  1.02+0.06  0.91+0.05  10.1+0.2  10.9+0.5  1.8+0.2  3.5+0.3\*  36+0 | 270+1  287+9  30.9+0.2  31.5+0.2  71+1.4  73.8+2.4  7.39+0.02  7.40+0.02  39+2  40+3  276+3  274+6  10.6+0.2  8.4+0.7\*  4.2+0.2  3.9+0.1  142+2  143+1  0.93+0.03  0.93+0.04  10.3+0.2  9.8+0.3  2.1+0.1  3.2+0.3\*  35+0 | 271+2  286+6  32.9+0.2  32.9+0.1  73.8+2.4  76.2+1.9  7.39+0.02  7.41+0.02  39+1  41+1  276+2  274+3  10.5+0.3  11.3+0.4  4.1+0.1  4.2+0.2  145+2  146+1  0.96+0.05  0.94+0.04  9.6+0.1  9.4+1.4  1.7+0.1  2.5+0.2\*  35+1 |
|  | DHCA 组 | 18+1\* | 24+4\* | 27+2\* | 35+2 |

表2 各组间参数的比较，\*表示p<0.05

如表1和表2所示，随着大鼠的体温逐渐降低，其心率逐渐降低，体温下降到20℃左右时其心跳停止。之后在复温过程中随着体温的逐渐升高到20℃左右时心跳自动恢复，并且随着体温的逐渐升高逐渐恢复致正常。Control组血压主要是在体外循环转流开始之后有一个下降的过程，之后则逐渐上升，并能维持正常。而DHCA组血压与control组相比较低，在降温过程中会出现下降，在深低温停循环期会降至0 mmHg，但是在复温的过程中，随着体温的升高，大鼠的

机体功能慢慢恢复，血压还是会出现上升并逐渐恢复正常。血气的各个指标中，由于应用的是纯氧，因此其氧分压都维持在300mmHg左右。Pco2则通过调整氧合器氧流量和呼吸机参数使其保持在35-45mmHg左右，所以各组相比较没有明显差别。由于氧合器是进行无血预充，血红蛋白浓度的最低值为5.5 g/dL，这在临床上是可接受的范围，并且大鼠的成功苏醒也说明这不影响正常生存。在复温过程中Hb逐渐升高可能与血液浓缩，液体进入第三间隙相关。

**[**

##### 讨论

大鼠的心脏解剖与人类心脏解剖极为其相似，亦分为左右心室及左右心房四个腔，最主要区别就是大鼠的心脏形态比较微小，大鼠的主动脉由左心室发出，在主动脉弓部分出三支血管，为右侧无名动脉、左侧颈总动脉以及左侧锁骨下动脉，继续下行成为降主动脉。大鼠的静脉系统与人体静脉系统不同，大鼠有两根上腔静脉和一根下腔静脉。大鼠下腔静脉接收来自尾侧体部的静脉血流，右侧上腔静脉引流右侧头部、背部的静脉血流，左侧上腔静脉汇集了左头部、背部和冠状静脉窦的血液，在大部分动物中表现为左侧上腔静脉的优势，右侧上腔静脉结扎不会造成头侧静脉的回流障碍。3根腔静脉在右心房的背侧汇合，形成了静脉窦，共同将全身血液引流到右心房，窦壁处的心肌向里皱折，形成两个小窦房瓣，将其与右心房分隔开来。大鼠的心率以及呼吸频率与人相比较快，而大鼠的体温及血压与人相比较为接近，大鼠的血液系统相关生理指标也与人相比也比较类似

[7]. 综上所述，从大鼠的心血管系统的解剖角度以及相关血液生理指标上来看，以大鼠为研究对象的DHCA模型，能够有效模拟临床，应用于实际工作中。除此之外，许多大型动物，例如猪、犬、羊、猴等缺乏行为学检测的统一标准，没有任何一种检测方式能够得到公众的认证。与大型动物相比较，大鼠作这实验研究工作对象已经有悠久的历史，因此对于其形为学检测的方法已有公认的标准，比如水迷宫、Y型电迷宫、开场实验等方法，这些都说明进行神经系统相关的动物实验研究，大鼠无疑是最佳的研究对象。

1968年，Popovic[11]等首次报道了大鼠深低温体外循环的模型，该模型实现了闭胸式体外循环，从右颈静脉和主动脉置管，将静脉血液通过重力作用引流至贮血槽中，经由滚轴泵、氧合器、热交换器、气泡式过滤器通过主动脉进行灌注。预充液体的总量为13.7ml，氧合器预充量为11.3ml。降温期间大鼠是通过冷水浴将体温维持在14℃，体外循环期间的灌注流量为32ml/kg/min，大约是体温14℃时心输出量的80%，灌注期间将大鼠置于天平上根据体重来调整泵的流量，以实现“平衡灌注”。实验结果表明，所有的大鼠都能在该模型转流下存活1小时，

80%大鼠可以存活3小时，但是没有提及长期存活的情况，此外，在模型中没有

详细提及如何进行主动脉插管，在吸入麻醉完成后完全依赖大鼠的自主呼吸，没有进行呼吸支持，而且该模型没有实现心脏的停跳。

进入21世纪后，研究者们对大鼠DHCA模型的转流装置及手术操作进行了诸多尝试，使得大鼠DHCA模型的研究不断地进步。大鼠DHCA模型建立的装置中，最重要的就是人工膜肺，而在先前的文献资料报道中，有不少研究者是使用改装过的小儿膜肺或者是定制的人工膜肺来进行研究[12, 13]。体外循环中管道预充液体量的大小是模型成功与否的一个重要因素，而人工膜肺是决定预充液体量的主要装置。近年来，随着科技水平与临床技术的发展，实验动物专用氧合器也有了较大的进步1983年，就有研究都设计了一种特殊的转碟式氧合器[14]，其预充量只有4.4ml，从而使整个CPB管道预充量控制在12ml以内。1996年，特制的动物专用小型膜式氧合器开始应用于实验研究当中[15]，气体交换面积为

0.05m2. Gourlay等[16]的微型氧合器预充量也小于4ml，并且成功实现了无血预充。除此之外，由于大鼠循环血量较小，在手术操作过程中以及血液标本采集过程中尽量减少失血，这也是减少预充液体量、避免血色素降低的一个重要方面。

在本实验所述的动物模型的人工膜肺是德国Martin公司定制的大鼠专用氧合器，预充量比较小，整个CPB管道中预充液需10mL，并且通过术中对大鼠进行血气分析的结果来看，Hb最低在5.5 g/dl左右，而且术后大鼠的成功苏醒证明血液的稀释程度不影响动物的存活，说明本实验中的人工膜肺成功实现了无血预充。除此之外，该氧合器的氧合面积为558 cm2，从血气检测指标来看也完全可以满足大鼠的氧合需要。膜肺可以与水箱供水管道相连接，方便进行热量交换。本模型对大鼠的血液灌注流量为100--120 ml/(kg·min)，约为大鼠心排量的60%--80%(160--180 ml/(kg·min))[10]。大鼠的成功苏醒也说明了灌注流量是足够的。

要达到这一灌注流量，充分的静脉血液回流就变得尤为重要，本实验是使用末端多孔的5F静脉导管，将导管推至大鼠右心房处，经验表明，良好的导管位置保证了良好的静脉血液回流，这是实现全流量体外循环的基础，然而该项操作是盲探性操作，导管的位置良好仅凭操作者的经验，因此具有较高的失败率。虽然开胸明视下进行颈静脉插管可以获得较好的静脉回流，并且与临床实际更为接近，但是开胸操作对动物的损伤较大，动物无法长期存活。Subramanian 等[17] ，

在1968年的实验研究中就描述了开胸、中心静脉引流的全流量体外循环，Gourlay等[16]的动物模型被认为是与临床实际CPB最为接近，他们采用了胸部正中和上腹部切口，右心房引流，经左心室顶部通过心室和主动脉瓣到升主动脉处置入灌注管，预充量也比较小，为12ml，流量比较满意，但无法长时间存活。开胸的操作虽然与临床实际相似，但是操作难度大，而且对实验动物创伤较大，与闭胸式DHCA动物模型相比较，闭胸式操作相对更简便，并且维持了胸廓的稳定性，最重要的是，开胸式体外循环与闭胸式体外循环相比，循环生理并没有太大的区别，而闭胸式操作显然更有利于术后大鼠呼吸功能的恢复。

良好的静脉引流是动物模型成功的基础。外周静脉插管引流效果欠佳，无法实现全流量体外循环，如果要达到满意的血液灌注流量，则必须使用大量的晶体液及胶体液预充，导致血液过度稀释，最终动物死亡。Subramanian等[17]的实验模型中尝试从心房插管，Popovic等[11]的实验研究中通过右心房将套管插入右心室，有些研究都则将心房插管改造成为三叉形，分别引流左、右上腔静脉及下腔静脉的静脉血流，均获得满意效果。Grocott 等[9] 的动物模型研究中利用血管

超声探头经食管定位，将静脉导管经由颈静脉置入右心房，并且在贮血槽上安装

Zkq 20151125

了负压吸引装置，以此获得了良好的导管定位与静脉引流。由此可见，静脉引流

通畅是实现大鼠全流量DHCA模型成功的关键。

大多先前的动物DHCA模型中采用气管切开的方式进行气管插管[12, 13]，虽然气管切开的插管方式临床上也有使用，也比较有效，但是对于动物来说是不小的损伤，并且在术中容易被分泌物及血液阻塞，术后气管伤口也会引起并发症，这些均不利于动物的长期存活，在Grocott等[9]的模型提及使用纤维喉镜进行气管插管，避免因气管切开产生的并发症，但是对设备要求较高，如今越来越多的研究者采用透光法经口明视下进行气管插管，安全无创，并且与临床更为相似。在动物实验过程中，还应监测心率、动脉血压、体温以及动脉血气指标。大鼠

DHCA模型的降温过程主要是通过在水箱与氧合器以管道相连接，水箱中加入冰水混合物与氧合器进行热交换来实现的，除此之外，动物体表辅以冰袋降温，而升温过程是将水箱中冰水换为热水，同时动物的体表辅以灯照加热、变温毯及热水袋等方法。

动物体外循环模型的小型化一直是研究者们的研究目标，理想的动物模型应该是能够模拟临床实际，并且最大程度地与人体的生理和病理状态相似。这样的动物模型就要求实验装置尽可能地与临床相仿，具体包括人工膜肺的预充液体量和气体交换面积，整体体外循环管路的预充液体量和预充液的种类，外科操作的路径及插管方法，实验过程中对动物生命体征进行的持续监测。综上所述，理想的DHCA动物模型应当具备以下特点：1、能够实现实验动物的长期存活，并进行术后行为学功能的检测；2、能够实现全流量动脉灌注；3、能够实现无血预充，血液稀释程度不足以影响大鼠的存活；4、能够充分进行降温与升温。在本实验中，我们是以Bettina[18]的DHCA模型为参照样本，以异氟醚吸入麻醉诱导大鼠后，采用透光法对大鼠进行气管插管，连接小动物呼吸机，调整呼吸频率及潮气量来辅助呼吸。为了不影响大鼠下肢的活动，为术后行为学检测排除干扰，我们摒弃常规的股动脉插管监测血压，改用腹壁浅动脉进行动脉血压监测，这项操作需要显微镜辅助，操作难度稍大；尾动脉分离置静脉针，留作动脉灌注端；右侧颈静脉分离剪开一小口，末端多孔的颈静脉插管置入右心房，充分引流静脉血液，

恒流蠕动泵可以精细调整转速，硅胶泵管可以减少血细胞的破坏，专用的实验动

Zkq 20151125

物氧合器预充液体量小，气体交换面积大，热交换效能高，这些都为大鼠的术后

长期存活提供了基础，为后期神经系统功能的检测与评估提供了保障。

参考文献

[1] Ballaux PK, Gourlay T, Ratnatunga CP *et al*. A literature review of cardiopulmonary bypass models for rats [ J]. Perfusion, 1999, 14 (6): 411-417

[2] Davis EA, Gillinov AM, Cameron DE, et a1． Hypothermic circulatory arrest as a surgical adjunct: a 5-year experience with 60 adult patients． Ann Thorae Surg, 1992, 53: 402 407．

[3] Jonas RA． Hypothermia, circulatory arrest, and the pediatric brain[J]． Cardio Thorac Vase Anesth, 1996, 10(1): 66-74.

[4] Jian Y, Luojia Y, Marc R, et al. Neuronal damage after hypothermic circulatory arrest and retrograde cerebral perfusion in the pig[J]. Ann Thorac Surg, 1996, 61: 1316-1322.

[5] Bokesch PM, Kapural M, et al. Neuroprotective, anesthetic, and cardiovascular effects of the NMDAantagonist, CNS5161A, inisoflurane-anesthetizedlambs[J]. Anesthesiology, 2000, 93(1): 202-8.

[6] Barreiro CJ, Williams JA, et al. Noninvasive assessment of brain injury in a canine model of hypothermic circulatory arrest using magnetic resonance spectroscopy[J]. Ann Thorac Surg, 2006, 81(5): 1593-8.

[7] Connold AL, Frischknecht R, Vrbova G. A simple method for cardiac surgery in rats[J]. Cell

Transplant, 1996, 5(3):405-409.

Zkq 20151125

[8] Sato Y, LaskowitzDT, Bennett ER, *et al*. Differential cerebral gene exp ression during cardiopulmonary bypass in the rat: evidence for apop tosis [J]. Anesth Analg, 2002, 94(6): 1389-1394.

[9] Grocott HP, Mackensen GB, Newman MF, *et al*. Neurological injury during cardiopulmonary bypass in the rat[ J ]. Perfusion, 2001, 16 (1): 75–81.

[10] Ballaux PK, Gourlay T, PATNATUNGA CP, et al. A literature review of cardiopulmonary bypass models for rat[J]. Perfusion, 1999, 14(6): 411-417.

[11] Popovic P, Horecky J, Popovic VP. Hypothermic cardiopulmonary bypass in white rats [J ]. Ann Surg, 1968, 168(2): 298 - 301.

[12] Fabre O, Zegdi R, Vineentelli A． et a1． A recovery model ofpartial cardiopulmonary bypassin the rat． Perfusion, 2001, 16: 215-220．

[13] Gourlay T, Ballaux PK, Draper ER, et a1． Early experiencewith a new technique and technology designed for the study ofpulsatile cardiopulmonary bypass in the rat． Perfusion, 2002, 17: 191—198．

[14] Fabre O, Zegdi R, Vincentelli A *et al*. A recovery model of partial cardiopulmonary bypass in the rat[J]. Perfusion, 2001, 16(3): 215-220.

[15] Sasaki S, Takigami K, Shiiya N *et al*. Partial cardiopulmonary by pass in rats for evaluating ischemia reperfusion injury[J ]. ASAIO J, 1996, 42 (6): 1027-1030.

[16] Gourlay T, Ballaux PK, Draper ER, et al. Early experience with a new technique and technology designed for the study of pulsatile cardiopulmonary bypass in the rat [ J ]. Perfusion, 2002, 17(3): 191 - 198.

[17] Subramanian V, McLeod J, Gans H. Effect of extracorporeal circulation onreticuloendothelial function. I. Experimental evidence for impaired reticuloendothelial function following cardiopulmonary bypass in rats[J ]. Surgery, 1968, 64(4) : 775- 784.

[18] Bettina Jungwirth, G. Burkhard Mackensen, et al. Neurologic outcome after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest in rats: Description of a new model [J]. Thorac Cardiovasc Surg 2006; 131: 805-12.

Zkq 20151125

第二部分Kappa阿片受体激动剂salvinorin A对深低温停

循环术后脑损伤保护作用的研究前言

在临床心血管外科手术中，对一些成年人的复杂心脏病手术、大血管手术、巨大脑动脉瘤以及婴幼儿先天性心脏病等进行手术操作时，必须将手术病人的体温降至16-18℃并且暂停病人机体里所有的血液循环，包括体外循环，方能进行手术操作，这项技术称为深低温停循环（DHCA）[1]技术。在深低温停循环期间，虽然病人的机体有深低温的保护，可以降低全身的代谢，但是脑是一个高代谢的器官，氧需求量比较高，并且是全身最不易耐受缺氧的器官，仅管大脑的重量仅占体重的2%，但是却消耗了接近全身20%的能量，与此同时大脑内没有糖储备，因此在停止循环期间脑组织是最容易受到损伤的器官[2]。即使是在临床上得到公认的停循环安全时限内，仍然不可避免地引起脑组织的损伤，造成术后近期和远期各种神经系统的并发症，包括z中kq风 ，2癫01痫51, 1舞25蹈病[3]等，儿童甚至出现智力发育迟滞，给病人的家庭和社会造成沉重的负担。研究深低温停循环期间的脑保护方法有着重要的现实意义，如何提高在脑组织在手术期间对缺氧的耐受能力，一直是国内外研究者关注的热点。对于DHCA期间脑保护的策略，研究者们进行了大量的基础实验以及临床研究。其中主要的保护措施有：深低温停循环+逆行性脑灌注（RCP），深低温停循环+选择性顺行性脑灌注（SCP）。根据Macro[4]的临床研究报道，心血管手术中应用DHCA+RCP能够延长安全时限至60 min，疗效明显优于单纯DHCA. Sasaguri[5]对临床20例患者进行研究，这些患者均接受了DHCA+RCP的胸主动脉手术，而术后均无神经系统并发症的表现。黎京芳

[6]等报道了2例进行深低温停循环重力脑逆行性灌注主动脉瘤手术，股动静脉插管建立体外循环，体温降至17℃，患者采取深度头低位，将带有气囊的主动脉灌注管插入胸主动脉近端进行阻断，控制股静脉的回流，将股动脉流量降至

1.5 L/min，维持CVP 20mmHg,完成脑逆灌。术后患者没有出现神经系统并发症，手术获得了成功。而临床应用RCP技术仍有不足之外：不符合正常生理；逆行灌注时导致无名静脉扩张、动脉回血从而影响外科手术操作；灌注时限相对较短，

必须同时进行DHCA；最重要的是，在应用到夹层动脉瘤手术中有导致假腔扩大，真腔受压的风险，从而产生严重并发症；流量控制不易，很可能会引起脑水肿和灌注不足。Griepp[7]研究报告表明RCP的应用未给临床预后带来改善，相反，长时间的逆行脑灌注，还会增加短期神经系统并发症的发生，并增加术后中风的可能性。与RCP相比较，SCP技术的优点在于：符合机体生理情况；灌注时限相对较长；不必同时进行深低温。但与此同时，SCP技术存在插管较多、操作比较复杂、容易造成斑块脱落导致栓塞、形成气栓等缺点。江朝光[8]进行了不同脑保护方法的研究，分别DHCA+SCP组，DHCA+RCP组以及单纯DHCA组，术后检测海马神经元的损伤情况，结果表明DHCA+SCP组的海马神经元损伤及凋亡明显少于另外两组。而齐弘炜[9]在研究不同脑保护方法时，采用神经元钙离子浓度作为检测对象，也得到了相似的结论。然而不论是RCP技术或者是SCP技术，这些脑保护的方法临床对照研究都相对较少，因此目前研究结果的真实可靠性有待进一步探讨。到目前为止还没有哪一种方法或者药物被认定在DHCA期间具有明确的脑保护作用[10]。

DHCA期间的脑损伤是在临床上可以预知的损伤，任何可以对脑保护有益

Zkq 20151125

的预处理措施都有潜在的保护价值。而缺血预处理对脑保护的作用已经得到公众

认证，而对于缺血预处理进行的大量研究又证明了产生的脑保护作用依赖于阿片受体[11, 12]。阿片受体分为mu受体，delta受体和kappa受体三种亚型，kappa受体激动剂的脑保护作用已经被多数研究者证实，在1994年，Baskin对猫的局灶性脑缺血进行的研究中就发现了kappa受体激动剂的脑保护效应[13]，在Fang 等的对于大鼠全脑缺血进行的脑保护研究，结果证明激动kappa 受体具有脑保护效应[14]。

Yang 等进行脑缺氧无糖损伤后，kappa受体激动剂可以减轻脑水肿程度[15]。而在

kappa受体激动剂中，一种天然的植物提取物质Salvinorin A引起了研究者的广泛关注，Salvinorin A是从墨西哥常年生植物迷幻鼠尾草中提取出的一种非含氮的二萜类物质，是迷幻鼠尾草具有影响精神作用的主要成分[16]，因其能够使人产生幻觉，长期以来被当地土著居民以及萨满巫师作为祭祀用，除此之外，还被用来治疗头痛、关节痛及腹泻等疾病。Valdés[17]研究发现，salvinorin A是高度选择性的kappa受体激动剂，比经典的kappa受体激动剂U69593和U50488更为高效[18]，并且是目前已知的唯一具有精神影响作用的天然非含氮的二萜类物质。研究表

明，salvinorin A能够保留大脑在缺血缺氧后的血管调节反应[19, 20]，而该调节反应的消失正是在缺血缺氧情况下脑损伤的重要原因[21, 22, 23]，而DHCA所引起的脑损伤也正是由于缺血缺氧引起的，因此，我们推测作为kappa受体激动剂的salvinorin A可以在深低温停循环引起的脑损伤中提供保护作用。综上所述，我们在此以大鼠

DHCA模型来模拟临床，用kappa受体激动剂的salvinorin A预处理来进行脑保护作用的研究，为临床应用提供基础研究数据。

##### 材料与方法

1．实验动物模型

第一部分已详细描述

2．神经功能的检测：Morris 水迷宫

2．1 实验仪器

水迷宫分析系统上海吉量软件科技有限公司

2．2 实验动物

雄性SD大鼠，购自上海西普尔－毕凯公司，体重400--450 g，14w—16w。

3．实验分组

SD大鼠18只，随机分为三组，每组6只（n=6），分别为：

Control组（n=6）：正常大鼠，不做任何处理，作为空白对照组；

DHCA组（n=6）：异氟醚吸入麻醉，深低温停循环40 min组；DHCA+salvinorin A组(n=6): 异氟醚吸入麻醉，salvinorin A 10 ug预处理，

深低温停循环40 min组。

各组手术操作及监测过程共需4小时（体外循环转流前外科手术操作1小时，降温20分钟，停止循环40分钟，复温45分钟，停止体外循环后呼吸机维持并监测生命体征1小时）。

4．实验方法

4．1 Morris水迷宫检测时间

大鼠DHCA术后第三天开始进行Morris水迷宫检测，每天于固定的同一时间对大鼠进行检测，连续检测六天，前五天水迷宫中有固定的平台供大鼠寻找，第六天撤去平台，考察大鼠对平台的记忆能力。

4．2 Morris 水迷宫检测内容

水迷宫是由水池和位于水池上方的自动录像装置以及分析系统组成，水池直径为1.8米，高度68cm，使用时向水池内注入清水，水深约40cm，向水中加入墨汁使之成为黑色，将平台放置在低于水平面约2cm处。水池的四周有三根柱子，柱子上贴有不同的标记物，一般为几何状图形作为空间标识，将水池平均分为四个象限，将一平台放入一个象限中，隐藏在水平面以下。每天进行检测时随机排列象限的顺序，依次分别将大鼠按相应的顺序放入水迷宫中进行游泳，水池上方的摄像头可以对大鼠在水池中游泳的行程进行摄影并记录于计算机内，进行相关的数据分析，以此评价大鼠的认知功能。水迷宫测试前后，大鼠可自由饮水饮食，进行水迷宫测试时，实验室要保证环境安静，无强烈光照，对大鼠的动作要尽量轻柔，避免产生刺激，每天结束水迷宫检测时，要将大鼠毛发吹干，再妥善放入笼中。

4．2．1定位巡航实验

前五天的水迷宫检测工作，每天检测前先随机编排好象限次序，将大鼠按照对应的象限处依次放入水迷宫内，让大鼠在水迷宫内自由游泳，水池上方的摄像头会采集大鼠的游泳轨迹，让其在水池内自发游泳90s，寻找水面下的平台。系统设置当大鼠寻找到水迷宫内的平台并在上面稳定10s就停止数据采集。若动物没有找到平台，可在数据采集结束后将动物引导到平台上停留10s，每只动物每天训练四次，每次训练间隔时间30s。获得性训练可以评估动物的短时记忆，以此来判断动物的自主活动及探索能力[24, 25]。

4．2．2探索实验

第六天的水迷宫检测工作与前五天相似，唯一区别是将水迷宫内的平台撤去，将大鼠从水迷宫中原平台所在象限的对侧象限放入水中，开始90s的探查训练，大鼠可根据水迷宫池边柱子上的几何标识以及前五天的寻找平台的记忆来寻找原平台，记录大鼠在目标象限，即原先放置平台的象限所花的时间以及进入的次数，以此作为空间记忆的检测指标。

5．统计方法

应用双因素重复测量数据的方差分析方法来对水迷宫的结果进行统计分析，p<0.05视为有统计学差异。

5. 结果

两只深低温停循环术后的大鼠在水迷宫游泳时不停在原位置打转，这样的数据采集结果去除，其余大鼠都可以正常完成水迷宫检测。在进行检测时观察到，空白对照组的大鼠在第一天被放入水迷宫内游泳时，起先会在试图通过池壁爬出水迷宫，但是尝试几次失败后就会在水池中游泳，在人为引导大鼠找到隐藏的平台后，大鼠便会很快地学会寻找并记忆平台的位置，而且在会在后续的平台寻找中出现逐渐缩小游泳路线包围圈的现象。而DHCA组以及DHCA+SA 10ug组的大鼠在第一天被放入水迷宫内游泳时，通常也会尝试从池壁爬出水面，失败后便在水迷宫内绕大圈游泳，在人为引导下找到隐藏平台后，在后续的寻找平台检查中也没有表现出明显的平台记忆，寻找平台的时间也比对照组要长一些。

图 2 大鼠定位航巡实验中潜伏期的变化



图 3 大鼠空间巡航实验游泳速度



表 3 大鼠空间巡航实验中潜伏期的变化

|  | | | latency(s) |  | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | day(1) | day(2) | day(3) | day(4) | day(5) |
| con | 77+5.8 | 41.5+6.23 | 21.2+4.3 | 16.5+3.5 | 15.4+3.8 |
| dhca | 90+0a | 86.6+1.7a | 73+5a | 63.7+5.4a | 56.1+8.1a |
| dhca+sa | 83.6+3.2 | 66.3+6.5b | 56.1+4.8b | 42.9+3.4b | 18.4+3.3b |

a: DHCA组与con组在同一时间点相比较p<0.05; b: DHCA组与DHCA+SA组在同一时间点相比较p<0.05.

图 4 大鼠在目标象限及对侧象限游泳时间的比较



P<0.05

Con

DHCA

DHCA+SA

图1不同分组下大鼠的潜伏期，DHCA组大鼠的潜伏期与对照组相比较有显著差异，而DHCA+SA组与DHCA组相比较有显著差异，DHCA组潜伏期明显延长了。图2不同分组大鼠的游泳速度没有显著差异。图3在实验的第六天撤去平台，DHCA组在原平台所在象限的游泳时间明显与DHCA+SA组相比有显著差异，DHCA组目标象限游泳时间明显缩

短。

就本实验结果显示，DHCA组大鼠的潜伏期自水迷宫检测的第1天起与

control组相比就有显著差异（p<0.05），表明DHCA术后动物的学习记忆能力确实受到影响，而加入salvinorin A组的大鼠与单纯进行DHCA组的大鼠相比，潜伏期有显著差异（p<0.05）,潜伏期明显得缩短了，而在第六天的空间探索实验中，DHCA+SA 10 ug组在目标象限的游泳时间比单纯DHCA组时间长, salvinorin A 确实有神经功能的保护作用。

# 讨论

深低温停循环是某些手术得以进行的必须技术。但是在停循环期间，脑组织仍然面临着脑损伤的风险，引起损伤的原因考虑如下：1、能量代谢耗竭学说，理论上来说，虽然低温降低氧耗、降低代谢，但是脑的能量代谢并没有完全停止，而在大脑处于深低温停循环时，即缺血缺氧的环境下，随着储备ATP的耗竭及线粒体的损伤，葡萄糖无氧代谢增加，引起酸性代谢产生积聚，导致细胞内酸中毒及细胞水肿，而酸中毒引起了内环境的紊乱，细胞正常的代谢活动无法进行，加重细胞膜的损伤，这是DHCA脑损伤的基础；2、神经元内钙超载学说；基于酸中毒，Na+-K+-ATP酶失活，导致细胞内Na+增多，而Ca2+不能泵出细胞外，Ca2+顺着浓度梯度内流，引起血脑屏障的破坏；3、自由基毒性学说，近年来研究发现，自由基的损伤以及因自由基导致的脂质过氧化反应是脑缺血后再灌注损伤的重要原因。组织缺血时，黄嘌呤脱氢酶水解成为黄嘌呤氧化酶，同时ATP分解为次黄嘌呤（黄嘌呤氧化酶的底物），在无氧条件下，不能够生成黄嘌呤。当血液再灌注时，氧化过程迅速进行，氧气被还原成超氧阴离子自由基，在机体微量铁离子的催化下会生成有更大毒性的羟基自由基，羟基自由基可侵袭膜中的不饱和脂肪酸，引起细胞膜、内质网膜、线粒体膜等生物膜的破坏。除此之外，自由基又可以加重钙超载引起的损伤。

本实验中也确实发现了深低温停循环术后神经系统的损伤，主要表现在水迷宫检测中潜伏期的延长。

Salvinorin A是高度选择性的kappa受体激动剂，提取自一种名为迷幻鼠尾草的天然植物，迷幻鼠尾草是一种常年生唇形科植物，原产地是墨西哥，喜潮湿环境，主要分面在亚热带地区。最初是在1962年被Hofmann和Wasson[26]在墨西哥瓦哈卡州所发现。长期以来，迷幻鼠尾草主要是被当地的萨满教巫医用来产来幻觉进行占卜预测等宗教活动，除此之外，还被当地人用来治疗腹泻、头痛及风湿性疾病。Hofmann和Wasson在见识了其神奇作用后，采摘了样品回国研究，至此才有了关于迷幻鼠尾草的较为科学的报道。近年来，由于迷幻鼠尾草能够引起幻觉，并且在许多国家属于非管制性药物，又相对安全，因此被人们多用于娱乐性消遣。在1982年Ortega[27]从迷幻鼠尾草叶子中分离提纯得到一种神奇的二

萜类物质，并证实该物质是迷幻鼠尾草主要的有效成分，将其命名为salvinorin

A，在20世纪90年代Siebert[28]证实其是一种能够影响精神的物质。salvinorin A

是高度选择性的kappa受体激动剂，比经典的kappa受体激动剂U69593 和

U50488更为高效[29]，而研究表明，salvinorin A能够保留脑缺血缺氧后血管的自动调节能力，因此我们推测其对脑缺血具有保护作用。在本实验研究中，我们在体外循环预充转流液里加入salvinorin A，能够有效改善深低温停循环术后大鼠在水迷宫中的表现，说明salvinorin A确实具有保护作用。

而本实验也存在着局限性，比如对大鼠术后认知功能的评估，仅使用了

Morris水迷宫的检测方法，具有一定的局限性，而应该增加更多行为学的检测方法来获得更全面的评价。

结 论

综上所述，本实验得出结论：深低温停循环术后大鼠的神经损伤，而应用

kappa阿片受体激动剂salvinorin A预处理后，起到脑保护作用，有助于减少神经损伤。

参考文献

[1] Chau KH, Ziganshin BA, Elefteriades JA: Deep hypothermic circulatory arrest: real-lifesuspended animation. Prog Cardiovasc Dis 2013; 56: 81-91.

[2] Elmistekawy EM, Rubens FD: Deep hypothermic circulatory arrest: alternative strategiesfor cerebral perfusion. A review article. Perfusion 2011; 26 Suppl 1: 27-34.

[3] Nelson DP, Andropoulos DB, Fraser CD, Jr.: Perioperative neuroprotective strategies. Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu 2008: 49-56.

[4] Macro DE, Marc AS, IWin JM, et al. Antegrade selective cerebral perfusion during operations on the thoracic aorta: Factors influeneing survival and neurologic outcome in 413 patients[J]. J Thorac Cardiovasc Surg,2002,124(4):1080-1086.

[5] Sasaguri S, Yamamoto S, Hosoda Y. What is safe time limit for retrograde cerebral perfusion with hypothemic circulatory arrest in aortic surgery[J]. JThoracCardiovascSurg,1996,37:441-444.

[6]黎京芳，向桂玉，宁晓华等.深低温停循环重力脑逆行灌注在主动脉瘤手术中的脑保护作

用[J].中国胸心血管外科临床杂志.2001,8（3）:213-214.

[7] Randall B Griepp. Cerebral protection during aortic arch surgery[J]. J Thorac Cardiovasc Surg,2003,125: S36-38.

[8]江朝光，齐弘炜，周春喜等.深低温停循环时不同脑保护方法对海马区神经元调亡的影响

[J].中华胸心血管外科杂志，2003，19(2):100-102.

[9]齐弘炜，江朝光，骆荩等.不同脑保护方法对神经元钙离子浓度的影响[J]，中国体外循环 杂志，2003,1（1）:19-21.

[10] Parissis H, Hamid U, Soo A, Al-Alao B: Brief review on systematic hypothermia for the protection of central nervous system during aortic arch surgery: a double-sword toolJCardiothoracSurg2011;6: 153.

[11] Zhou Y, Fathali N, Lekic T, Ostrowski RP, Chen C, Martin RD, Tang J, Zhang JH: Remote limb ischemic postconditioning protects against neonatal hypoxic-ischemic brain injury in ratpups by the opioid receptor/Akt pathway. Stroke 2011; 42: 439-44.

[12] Rehni AK, Singh N, Jaggi AS: Possible involvement of insulin, endogenous opioids and

Calcitonin gene-related peptide in remote ischaemic preconditioning of the brain. Yakugaku

Zasshi 2007; 127: 1013-20.

[13] Baskin DS, Widmayer MA, Browning JL, Heizer ML, Schmidt WK: Evaluation of delayed treatment of focal cerebral ischemia with three selective kappa-opioid agonists in cats. Stroke1994; 25: 2047-53; discussion 2054.

[14] Fang S, Xu H, Lu J, Zhu Y, Jiang H: Neuroprotection by the kappa-opioid receptor agonist, BRL52537, is mediated via up-regulating phosphorylated signal transducer and activator of transcription-3 in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. Neurochem Res 2013; 38:2305-12.

[15] Yang L, Wang H, Shah K, Karamyan VT, Abbruscato TJ: Opioid receptor agonists reduce brain edema in stroke. Brain Res 2011; 1383: 307-16.

[16] Valdés, L. J., Butler, W. M., Hatfield, G. M., Paul, A. G., Koreeda, M.,1984. DivinorinA, a psychotropicterpenoid and divinorinB from the hallucinogenic Mexicanmint, Salvia divinorum. J. Org. Chem.49,4716–4720.

[17] Valdés, L. J.,1994. Salvia divinorum and theuniquediterpenehallucinogen, salvi- norin (divinorin) A. J. Psychoact. Drugs.

[18] Roth BL, Baner K, Westkaemper R, Siebert D, Rice KC, Steinberg S. 2002. Salvinorin A: a potent naturally occurring nonnitrogenous k opioidselective agonist. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 11934–11939.

[19] Su D, Riley J, Armstead WM, Liu R: Salvinorin A Pretreatment Preserves Cerebrovascular Autoregulation After Brain Hypoxic/Ischemic Injury via Extracellular Signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase in Piglets. Anesthesia and analgesia 2012; 114: 200-4.

[20] Su D, Riley J, Kiessling WJ, Armstead WM, Liu R: Salvinorin A producescerebrovasodilation through activation of nitric oxide synthase, kappa receptor, and adenosinetriphosphate-sensitive potassium channel. Anesthesiology 2011; 114: 374-9.

[21] Armstead WM: Altered release of prostaglandins contributes to hypoxic/ischemicimpairment of NOC/oFQ cerebrovasodilation. Brain Res 2000; 859: 104-12.

[22] Ben-Haim G, Armstead WM: Role of cAMP and K(+) channel-dependent mechanisms

Inpiglethypoxic/ischemic impaired nociceptin/orphanin FQ-induced cerebrovasodilation. BrainRes 2000; 884: 51-8.

[23] Armstead WM: Contribution of kca channel activation to hypoxic cerebrovasodilationdoes not involve NO. Brain Res 1998; 799: 44-8.

[24] M. Yu. Stepanichev, Yu. V. Moiseeva, N. A. Lazareva, et al. Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25–35) peptide induces impairment in short-term rather thanlong-term memory in rats. Brain Research Bulletin 61 (2003) 197–205.

[25] Vasile Hefcoa, \*, Kiyofumi Yamadab, Andreea Hefco, et al. Effects of nicotine on memory impairment induced by blockade ofmuscarinic, nicotinic and dopamine D2 receptors in rats. European Journal of Pharmacology 474 (2003) 227–232.

[26] Wasson, R. G., 1962. A NewPsychotropicDrugfromtheMintFamily. Botanical Museum Leaflets, HarvardUniversity20.

[27] Ortega, A., Blount, J. F., Manchand, P. S., 1982. Salvinorin, anewtrans-neoclerodane diterpenefrom Salvia divinorum (Labiatae). J. Chem. Soc. PerkinsTrans.1, 2505–2508.

[28] Siebert, 1994. Salvia divinorum and salvinorinA: newpharmacologic findings. J. Ethnopharmacol. 43,53–56.

[29] Roth BL, Baner K, Westkaemper R, Siebert D, Rice KC, Steinberg S. 2002. Salvinorin A: a potent naturally occurring nonnitrogenous k opioidselective agonist. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 11934–11939.

附 录

综述

大鼠深低温停循环模型的研究进展

体外循环技术自上个世纪50年代开始应用于临床[1]，大大推动了心血管手术的发展，现在已经成为心血管手术不可缺少的手段。深低温停循环（DHCA）技术则为某些复杂性的先心病，大血管手术和复杂脑动脉瘤等无法在单纯体外循环下完成的手术提供了可能。DHCA技术是指在体外循环的帮助下，将病人的体温降低到18℃左右，然后停止包括体外循环在内的所有循环，这样在低温的保护下，可以实现手术野完全无血，从而实现单纯体外循环下不能完成的手术。然而，研究表明即使在临床公认的停循环安全时限（40 min）内，手术后仍出现各种并发症，尤其是神经系统并发症[2]。Jonas [3]发现深低温手术后的病人近期出现手足徐动、短暂惊厥；远期发生认知功能障碍，儿童甚至会出现智力发育迟滞。而这些神经并发症目前还没有很好的预防和治疗的方法，其中一个最主要的原因就是没有合适的动物模型。各种临床前研究都需要能够在动物模型上证明，然后才能进行临床实验。早些年关于DHCA动物模型的研究大多数仍采用猪、犬、羊[4, 5, 6]等大型动物，虽然这些大型动物能够很好地模拟临床，有较高的研究价值，但是耗费大量的人力，往往需要多学科研究者共同参与，除此之外，大动物费用高昂，对手术环境要求很高，并且术中的管理很困难，再者，术后的存活率比较低。在这种情况下，大鼠作为实验研究对象进入了研究者的视线，并逐渐成为研究的热点。

1968年，Popovic[7]等首次报道了大鼠深低温体外循环的模型，该模型实现了闭胸式体外循环，从右颈静脉和主动脉置管，将静脉血液通过重力作用引流至贮血槽中，经由滚轴泵、氧合器、热交换器、气泡式过滤器通过主动脉进行灌注。预充液体的总量为13.7ml，氧合器预充量为11.3ml。降温期间大鼠是通过冷水浴将体温维持在14℃，体外循环期间的灌注流量为32ml/kg/min，大约是体温14℃时心输出量的80%，灌注期间将大鼠置于天平上根据体重来调整泵的流量，以实现“平衡灌注”。实验结果表明，所有的大鼠都能在该模型转流下存活1小时，

80%大鼠可以存活3小时，但是没有提及长期存活的情况，此外，在模型中没有详细提及如何进行主动脉插管，在吸入麻醉完成后完全依赖大鼠的自主呼吸，没有进行呼吸支持，而且该模型没有实现心脏的停跳。

进入21世纪后，研究者们对大鼠DHCA模型的转流装置及手术操作进行了诸多尝试，使得大鼠DHCA模型的研究不断地进步。大鼠DHCA模型建立的装置中，最重要的就是人工膜肺，而在先前的文献资料报道中，有不少研究者是使用改装过的小儿膜肺或者是定制的人工膜肺来进行研究[8,9]。体外循环中管道预充液体量的大小是模型成功与否的一个重要因素，而人工膜肺是决定预充液体量的主要装置。近年来，随着科技水平与临床技术的发展，实验动物专用氧合器也有了较大的进步1983年，就有研究都设计了一种特殊的转碟式氧合器[10]，其预充量只有4.4ml，从而使整个CPB管道预充量控制在12ml以内。1996年，特制的动物专用小型膜式氧合器开始应用于实验研究当中[11]，气体交换面积为

0.05m2. Gourlay等[12]的微型氧合器预充量也小于4ml，并且成功实现了无血预充。除此之外，由于大鼠循环血量较小，在手术操作过程中以及血液标本采集过程中尽量减少失血，这也是减少预充液体量、避免血色素降低的一个重要方面。

充分的静脉血液回流是实现全流量转流的基础，本实验是使用末端多孔的

5F静脉导管，将导管推至大鼠右心房处，然而该项操作是盲探性操作，导管的位置良好仅凭操作者的经验，因此具有较高的失败率。虽然开胸明视下进行颈静脉插管可以获得较好的静脉回流，并且与临床实际更为接近，但是开胸操作对动物的损伤较大，动物无法长期存活。Subramanian等[13]，在1968年的实验研究中就描述了开胸、中心静脉引流的全流量体外循环，Gourlay等[12]的动物模型被认为是与临床实际CPB最为接近，他们采用了胸部正中和上腹部切口，右心房引流，经左心室顶部通过心室和主动脉瓣到升主动脉处置入灌注管，预充量也比较小，为12ml，流量比较满意，但无法长时间存活。开胸的操作虽然与临床实际相似，但是操作难度大，而且对实验动物创伤较大，与闭胸式DHCA动物模型相比较，闭胸式操作相对更简便，并且维持了胸廓的稳定性，最重要的是，开胸式体外循环与闭胸式体外循环相比，循环生理并没有太大的区别，而闭胸式操作显然更有利于术后大鼠呼吸功能的恢复。如果外周静脉插管引流效果欠佳，则无法实现全流量体外循环，若想要达到满意的血液灌注流量，则必须使用大量的

晶体液及胶体液预充，导致血液过度稀释，最终动物死亡。Subramanian等[13]的实验模型中尝试从心房插管，Popovic等[7]的实验研究中通过右心房将套管插入右心室，有些研究都则将心房插管改造成为三叉形，分别引流左、右上腔静脉及下腔静脉的静脉血流，均获得满意效果。Grocott等[9]的动物模型研究中利用血管超声探头经食管定位，将静脉导管经由颈静脉置入右心房，并且在贮血槽上安装了负压吸引装置，以此获得了良好的导管定位与静脉引流。由此可见，静脉引流通畅是实现大鼠全流量DHCA模型成功的关键。

大多先前的动物DHCA模型中采用气管切开的方式进行气管插管[8, 9]，虽然气管切开的插管方式临床上也有使用，也比较有效，但是对于动物来说是不小的损伤，并且在术中容易被分泌物及血液阻塞，术后气管伤口也会引起并发症，这些均不利于动物的长期存活，在Grocott等[9]的模型提及使用纤维喉镜进行气管插管，避免因气管切开产生的并发症，但是对设备要求较高，如今越来越多的研究者采用透光法经口明视下进行气管插管，安全无创，并且与临床更为相似。小结

综上所述，理想的DHCA动物模型应当具备以下特点：1、能够实现实验动物的长期存活，并进行术后行为学功能的检测；2、能够实现全流量动脉灌注；3、能够实现无血预充，血液稀释程度不足以影响大鼠的存活；4、能够充分进行降温与升温。虽然以大鼠为实验对象的深低温停循环模型已经成功建立，但是仍然存在不足之处，最主要的问题就是大鼠的存活率不高，颈静脉插管成功率较低等，这此技术上的存在的问题仍需要进一步地改进。

参考文献

[1] Ballaux PK, Gourlay T, Ratnatunga CP *et al*. A literature review of cardiopulmonary bypass models for rats [ J]. Perfusion, 1999, 14 (6): 411-417.

[2] Davis EA, Gillinov AM, Cameron DE, et a1． Hypothermic circulatory arrest as a surgical

Adjunct: a 5-year experience with 60 adult patients．Ann Thorae Surg, 1992, 53: 402 407．[3] Jonas RA．Hypothermia, circulatory arrest, and the pediatric brain[J]．Cardio Thorac Vase

Anesth, 1996, 10(1): 66-74.

[4] Jian Y, Luojia Y, Marc R, et al. Neuronal damage after hypothermic circulatory arrest and retrograde cerebral perfusion in the pig[J]. Ann Thorac Surg, 1996, 61: 1316-1322.

[5] Bokesch PM, Kapural M , et al. Neuroprotective , anesthetic, and cardiovascular effects of the NMDA antagonist, CNS 5161A, in isoflurane-anesthetized lambs[J]. Anesthesiology, 2000, 93(1): 202-8.

[6] Barreiro CJ, Williams JA, et al. Noninvasive assessment of brain injury in a canine model of hypothermic circulatory arrest using magnetic resonance spectroscopy[J]. Ann Thorac Surg, 2006, 81(5): 1593-8.

[7] Popovic P , Horecky J , Popovic VP. Hypothermic cardiopulmonary bypass in white rats [J]. Ann Surg , 1968 , 168(2) : 298 - 301.

[8] Fabre O, Zegdi R, Vineentelli A． et a1． A recovery model ofpartial cardiopulmonary bypass in the rat． Perfusion, 2001, 16: 215-220．

[9] Gourlay T , Ballaux PK , Draper ER , et a1． Early experiencewith a new technique and technology designed for the study ofpulsatile cardiopulmonary bypass in the rat． Perfusion, 2002, 17: 191—198．

[10] Fabre O , Zegdi R , Vincentelli A *et al*. A recovery model of partial cardiopulmonary bypass in the rat[J]. Perfusion, 2001, 16(3): 215-220.

[11] Sasaki S , Takigami K, Shiiya N *et al*. Partial cardiopulmonary by pass in rats for evaluating ischemia reperfusion injury[J]. ASAIO J , 1996 , 42 (6): 1027-1030.

[12] Gourlay T, Ballaux PK, Draper ER , et al. Early experience with a new technique and technology designed for the study of pulsatile cardiopulmonary bypass in the rat [ J]. Perfusion , 2002 , 17(3): 191 - 198.

[13] Subramanian V , McLeod J , Gans H. Effect of extracorporeal circulation on

Reticuloendothelial function. I. Experimental evidence for impaired reticuloendothelial function following cardiopulmonary bypass in rats[J]. Surgery , 1968 , 64(4): 775- 784.

致 谢

研究生三年来，在课题设计、现场、实验室工作、论文撰写等各个方面，梁启胜导师给予了悉心和无私帮助。导师敏锐的洞察力、渊博的学识、严谨的治学态度及忘我的奉献精神，是我永远学习的楷模。

衷心感谢上海交通大学附属仁济医院麻醉科王祥瑞教授、苏殿三老师、郑蓓洁老师、杨中伟老师、美国杜克大学麻醉实验室马青教授在学习、研究等方面给予的帮助指导和支持。

衷心感谢上海交通大学附属仁济医院麻醉科实验室的师姐徐欢、师妹吴广喜在实验研究工作上给予我的大力支持与无私帮助。

衷心感谢我的同学陶静、李丽萍、陈菲菲等在学习、生活、实验室工作等方面给予的帮助。

衷心感谢蚌埠医学院第一附属医院麻醉科全体老师，对我学习和工作的支持与帮助，以及孜孜不倦地教导。

有了你们的帮助，我才可以在研究生三年里获得了更大的进步！