

依达拉奉对蛛网膜下腔出血后急性脑血管痉挛大鼠的影响

马海花¹, 潘娟², 李达²

(1. 河南省汝州市第一人民医院大内科, 汝州 467500; 2. 郑州市第九人民医院姑息科, 郑州 450000)

【摘要】目的:探讨依达拉奉(edaravone, E)对蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)大鼠急性脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)的保护作用及对血中 S100B、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)表达水平的影响。**方法:**60 只 Wistar 大鼠随机分为对照组(C 组)、生理盐水组(N 组)、单纯 SAH 组(SAH 组)和 SAH+依达拉奉组(SAH+E 组)。应用枕大池二次注入自身动脉血法制作大鼠 SAH 后急性 CVS 动物模型, C 组于术前, 其余 3 组分别于术后 6、24、72 h 采用显微图像分析仪测量各组基底动脉直径, 并 ELISA 法测定各组血清 S100B、ET-1 水平。**结果:**术后同一时间点基底动脉直径由小到大依次为: SAH 组、SAH+E 组、N 组、C 组, 除 N、C 组之间无统计学差异外, 其余两两比较均有统计学意义, 析因分析提示仅不同处理方法对结果有影响; 基底动脉 72 h 内持续痉挛, 时间无影响; 术后同一时间点血清 S100B、ET-1 水平由高到低依次为: SAH 组、SAH+E 组、N 组、C 组, 除 N、C 组之间无统计学差异外, 其余两两比较均有统计学意义, 析因分析提示仅不同处理方法对结果有影响; 表达量 72 h 内持续增高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**血清 S100B 水平和 ET-1 水平的变化与 SAH 后急性 CVS 有关。依达拉奉的应用能够使血清 S100B、ET-1 水平恢复正常从而起到改善 SAH 后急性 CVS 的作用。

【关键词】蛛网膜下腔出血; 急性脑血管痉挛; 依达拉奉; S100B; 内皮素-1

【中图分类号】322.81

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-06-11

Effects of edaravone on acute cerebral vascular spasm after subarachnoid hemorrhage in rats

Ma Haihua¹, Pan Juan², Li Da²

(1. Department of Internal Medicine, the First People's Hospital in Ruzhou City of Henan Province;

2. Department of Palliative Care, the Ninth People's Hospital of Zhengzhou City)

【Abstract】Objective: To explore the protection of edaravone on acute cerebral vasospasm(CVS) after subarachnoid hemorrhage(SAH) in rats and effects of edaravone on expressions of serum S100B and endothelin-1(ET-1). **Methods:** Totally 60 Wistar rats were randomly assigned to four groups: control group(group C), normal saline group(group N), simple group of SAH(group SAH) and group of SAH+edaravone(group SAH+E). CVS model after SAH was made by injecting rats' own blood into cisterna twice. Microscopic image analysis was used to measure the basal artery diameter and ELISA was employed to determine S100B and ET-1 serum levels preoperatively in group C and at 6, 24, 72 h postoperatively in others groups. **Results:** Postoperative basilar artery diameters at the same time were in the following order(from small to large): group SAH, group SAH + E, group N and group C. There was no statistically significant difference between groups N and C and the differences were statistically significant between the other groups. Factorial analysis suggested that different treatments exerted different effects on the results. Basilar artery spasms sustained for 72 h. At the same time after operation, serum S100B and ET-1 levels were in the following order(from high to low): group SAH, group SAH+E, group N and group C. There were statistically significant differences between groups but there was no difference between groups N and C. Factorial analysis suggested that different treatments exerted different effects on the results. Serum S100B and ET-1 increased consistently within 72 h, with statistically significant differences($P<0.05$). **Conclusions:** Serum S100B and ET-1 levels related with acute CVS after SAH. Edaravone can make serum S100B and an ET-1 level back to normal and thus plays a controlling role in improving acute CVS after SAH.

【Key words】subarachnoid hemorrhage; acute cerebral vasospasm; edaravone; S100B; endothelin-1

作者简介: 马海花, Email: 18703605932@126.com,

研究方向: 心脑血管疾病。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000059.html>

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是最常见的脑血管意外之一。脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)是其最严重的并发症,发生率为30%~90%^[1],由于严重的局部脑组织缺血或迟发性缺血性脑损害,甚至导致脑梗死,成为致死和重残的主要原因^[1-2]。学者认为 SAH 后急性 CVS 是一段时间内由于血管周围物质及血液中所含的成分造成脑血管的收缩,具有发生迅速、严重广泛的特点。脑损伤蛋白 S100B 蛋白在评价脑损伤程度及评估预后过程中具标志性意义^[3],内皮素-1(endothelin-1, ET-1)在脑损伤过程中亦有明显变化,在 CVS 中起到重要的作用^[2,4]。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

成年健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,体质量 300~350 g,随机分为 4 组,对照组(C 组)6 只;基底动脉直径测量前不作任何特殊处理;生理盐水组(N 组)、SAH 组、SAH+E 组均 18 只,各组分术后 6、24、72 h 3 个亚组, $n=6$ 。N 组:首次枕大池抽取脑脊液 1 ml,注入 37 °C 0.9%氯化钠溶液 0.5 ml/kg,24 h 后再次注入等量 0.9%氯化钠溶液;SAH 组:抽出 1 ml 清亮脑脊液后用 26 号腰穿针在大于 2 min 的时间内注入自体动脉血 0.5 ml/kg,24 h 后再次注入等量动脉血;SAH+E 组:依达拉奉于二次注血后 3 h 按 80 mg/kg 剂量腹腔注射,间隔 3 h 以同等的剂量重复 1 次。每组在相应时间点测量基底动脉直径,并采集血液标本检测血清 S100B 及 ET-1 水平。

1.2 大鼠基底动脉直径的测量

取大鼠称质量后,10%水合氯醛以 3 ml/kg 剂量腹腔注射麻醉,麻醉成功后仰卧位将大鼠固定于鼠板上,颈部去皮,消毒,沿颈正中中线纵行切开皮肤,沿中线钝性分离皮下组织及甲状腺,离断气管前肌切断气管,将近心端固定在胸壁上,确保气管通畅,切断食管及食管后肌肉,尽可能大的暴露斜坡,以 3 mm 骨钻钻透颅骨,止血钳扩大骨窗,使基底动脉充分暴露,而后置于显微镜下观察,采用显微图像分析仪测定基底动脉 3 个部位:椎-基底动脉交汇处、基底动脉脑桥中部及分叉处直径取其平均值,计数。

1.3 血清 S100B 和血清 ET-1 水平的测定

相应时间点测基底动脉直径后,摘眼球法取血 5 ml,室温血液自然凝固 10~20 min 后,离心 20 min 左右(2 000~3 000 r/min)。收集上清,分 2 份低温保存,采用双抗体夹心 ELISA 法分别测定 S100B、ET-1 水平,试剂盒分别由南京建成生物工程研究所和中国人民解放军总医院东亚免疫研究所提供。

1.4 入选标准

取血后颈椎脱臼法处死,开颅,直接观察判断建模是否成功,造模不成功大鼠剔除,未达时间点死亡大鼠剔除,同批次大鼠补充。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 数据分析系统分析数据。计量资料符合正态分布,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析法和 3×3 析因分析法分析。多组间两两比较采用 SNK- q 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠基底动脉直径

2.1.1 基底动脉显微镜观察 C 组、N 组大鼠基底动脉形态饱满,动脉周围无血性物质,动脉搏动有力;SAH 组大鼠基底动脉直径明显变小,动脉周围可见血性物质,动脉搏动幅度减小。SAH+E 组大鼠基底动脉较 C 组、N 组直径细,但较 SAH 组基底动脉直径粗,动脉周围可见少量血性物质,动脉搏动幅度较 SAH 组明显。

2.1.2 基底动脉直径比较 与 C 组大鼠基底动脉直径比较, N 组术后各时间点基底动脉直径差异无统计学意义 ($P>0.05$);SAH 组、SAH+E 组大鼠术后 6、24、72 h 基底动脉直径与 C 组比较,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)(表 1)。进行进一步 3×3 析因分析法分析,3 种处理方法间 $F=201.7, P=0.000$;3 个时间点 $F=0.61, P=0.549$;处理方法与时间间交互效应 $F=0.621, P=0.650$ 。说明 3 种处理方法间的差别有意义,而 3 个时间点的差别无意义且处理方法与时间点之间未发现交互效应。

2.2 血清 S100B 水平、ET-1 表达水平变化

与 C 组相比, N 组各时间点血清 S100B 水平、ET-1 水平略增高,但无统计学意义 ($P>0.05$),SAH 组、SAH+E 组大鼠术后 6、24、72 h 血清 S100B 水平、ET-1 水平与 C 组比较,差

表 1 各组各时间点大鼠基底动脉直径比较 ($\mu\text{m}, n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of basilar artery diameter in rats at each time point ($\mu\text{m}, n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	术前	术后 6 h	术后 24 h	术后 72 h
C 组	239.2 \pm 8.8	-	-	-
N 组	-	240.0 \pm 11.4	238.7 \pm 20.5	236.5 \pm 13.2
SAH 组	-	137.8 \pm 15.9 ^a	132.1 \pm 12.3 ^a	138.3 \pm 18.5 ^a
SAH+E 组	-	169.5 \pm 15.4 ^{ab}	170.3 \pm 14.7 ^{ab}	183.1 \pm 15.1 ^{ab}

注: $F=50.89, P=0.000$; a, 与 C 组相比, $P<0.05$; b, 与 SAH 组相比, $P<0.05$; -, 未测定

表 2 各组各时间点大鼠血清 S100B 表达水平比较 ($\mu\text{g/L}$, $n=6, \bar{x} \pm s$)Tab.2 Comparison of serum S100B expressions in rats at each time point ($\mu\text{g/L}$, $n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	术前	术后 6 h	术后 24 h	术后 72 h
C组	0.52 ± 0.17	-	-	-
N组	-	0.53 ± 0.11	0.52 ± 0.15	0.49 ± 0.17
SAH组	-	1.15 ± 0.24 ^a	1.14 ± 0.20 ^a	1.10 ± 0.16 ^a
SAH+E组	-	0.88 ± 0.13 ^{ab}	0.81 ± 0.15 ^{ab}	0.79 ± 0.19 ^{ab}

注: $F=15.21, P=0.000$; a, 与 C 组相比, $P<0.05$; b, 与 SAH 组相比, $P<0.05$; -, 未测定

表 3 各组各时间点大鼠血清 ET-1 表达水平比较 (pg/ml , $n=6, \bar{x} \pm s$)Tab.3 Comparison of serum ET-1 expressions in rats at each time point (pg/ml , $n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	术前	术后 6 h	术后 24 h	术后 72 h
C组	79 ± 12	-	-	-
N组	-	80 ± 11	83 ± 12	78 ± 16
SAH组	-	229 ± 26 ^a	237 ± 27 ^a	223 ± 25 ^a
SAH+E组	-	171 ± 17 ^{ab}	183 ± 21 ^{ab}	180 ± 18 ^{ab}

注: $F=72.26, P=0.000$; a, 与 C 组相比, $P<0.05$; b, 与 SAH 组相比, $P<0.05$; -, 未测定

异均有统计学意义 ($P<0.05$) (表 2、表 3); 进一步作 3×3 析因分析法分析, 血清 S100B 水平: 3 种处理方法间 $F=59.251, P=0.000$; 3 个时间点 $F=0.55, P=0.583$, 处理方法与时间间交互效应 $F=0.06, P=0.994$; 3 种处理方法间 $F=255.7, P=0.000$; 3 个时间点 $F=0.86, P=0.429$, 血清 ET-1 表达水平: 处理方法与时间间交互效应 $F=0.29, P=0.883$ 。以上结果均显示, 血清 S100B 和血清 ET-1 水平分别在 3 种处理方法间的差别有意义, 而 3 个时间点间的差别无意义且处理方法与时间点之间未发现交互效应。

3 讨论

SAH 后 CVS 是多种发病机制综合作用的结果, 急性 CVS 表现为 SAH 后血管舒张和血管收缩的功能失调。

Gules 等^[5]将常用的 3 种制备大鼠 SAH 模型的方法进行比较, 推荐枕大池二次注血法造模, 以更好的模拟人类 SAH 时的病理生理改变。采用显微图像分析仪测定基底动脉 3 个部位直径^[6]。

作为经典的氧自由基清除剂, 依达拉奉已被证实^[7-8]可抑制脂质过氧化、有效消除自由基; 抑制脑血管痉挛, 抑制脑细胞、神经元过氧化, 抑制炎症介质白三烯的形成, 减轻脑缺血程度及其引起的水肿和组织损伤。主用于急性脑梗死治疗, 亦可用于具出血倾向的脑缺血治疗以及脑出血后期的脑保护应用。不良反应发生率低, 应用安全有效。

哺乳动物的 S100B 超过 96% 存在于中枢神经系统, 为脑特异性损伤蛋白^[3]。生理量时具有促进神

经系统的生长发育、调节神经细胞的增殖分化, 调节信息物质传递等显著作用, 而颅脑损伤时 S100B 蛋白呈现高水平表达, 自受损细胞大量溢出, 高表达量的 S100B 蛋白具明显神经毒性作用, 可引起钙超载, 过度增加 NO 浓度, 诱导炎症因子产生, 同时过量的 NO 具有神经毒性, 进一步增强炎症介质对 S100B 生成的刺激, S100B 蛋白本身的正反馈作用也可引起脑损伤性级联反应, 导致中枢神经系统内环境破坏和神经细胞凋亡^[9]。既往研究证明, 依达拉奉清除自由基的同时还可以通过调节 NO 的表达, 减轻炎症反应, 起到脑保护作用^[4], 亦可有效降低中、重型颅脑外伤患者血清 S100B 蛋白表达, 使用越早效果越明显^[10]。

ET-1 是迄今所知的作用最强的缩血管物质且作用时间持久, 主要由血管内皮细胞内合成, 为反映内皮细胞损伤状况的敏感指标。刺激 ET-1 合成的因素还包括: 肾上腺素、血管加压素、血栓素、血管紧张素、炎症细胞因子以及血液流变学变化及缺氧等理化因素。同时依达拉奉已被研究证明对急性脑梗死后的 ET-1 表达也有明显降低作用^[11]。

本研究结果显示: 与 C 组比较, N 组术后各时间点基底动脉直径差异无统计学意义, SAH 组、SAH + E 组大鼠术后 6、24、72 h 基底动脉直径与 C 组比较均有统计学意义, 提示脑脊液中动脉血的出现可引起基底动脉痉挛且出血后 72 h 时痉挛仍在持续; SAH 组与 SAH+E 组术后 6、24、72 h 时基底动脉直径相比较细, 差异有统计学意义, 提示 SAH 后依达

拉奉的及时应用有效地改善了基底动脉的痉挛程度。析因分析结果提示:不同分组处理之间对结果的影响有统计学意义,而每组的 3 个时间点间差异无统计学意义,处理方法与时间之间交叉效应无意义。综上所述,SAH 后 72 h 内基底动脉的痉挛持续,依达拉奉的及时应用是改善基底动脉痉挛的主要因素,时间因素及处理方法与时间的交互效应影响无意义。

与 C 组比较,N 组术后各时间点血清 S100B、ET-1 水平无统计学意义,SAH 组、SAH+E 组大鼠术后 6、24、72 h 血清 S100B、ET-1 水平与 C 组比较增高,差异均有统计学意义,提示脑脊液中异常血液成分的存在可对脑组织产生不良刺激,并导致脑损伤蛋白 S100B 和 ET-1 的持续异常增高,促进脑组织进一步损伤。SAH 组与 SAH+E 组术后 6、24、72 h 时血清 S100B、ET-1 水平比较更高,差异均有统计学意义,另析因分析提示:不同分组处理对血清 S100B、ET-1 水平的差异影响有统计学意义,而每组的 3 个时间点对结果的影响无统计学意义,时间因素影响无意义;处理方法与时间之间交叉效应无意义。提示:①SAH 后血清 S100B、ET-1 在 72 h 内持续异常增高表达;②依达拉奉的及时应用可有效增加脑组织的稳定性,减少脑损伤蛋白 S100B 和内皮素 ET-1 的异常表达,减轻细胞损伤;③时间因素及处理方法与时间的交互效应影响无意义。

综上所述,SAH 发生 ET-1 的高表达机制可能为以下几方面:①凝血过程中血栓烷素刺激 ET-1 释放;②SAH 发生后大量红细胞溶解,释放的氧合血红蛋白刺激内皮细胞和平滑肌细胞合成和释放 ET-1^[12];③出血后应激刺激导致的其他血管活性物质、肾上腺素、血管紧张素等激素的刺激致过量 ET-1 生成;④局部缺血性损伤可能引起脑受累导致微血管的内皮细胞产生 ET-1 和漏出增加,并产生剧烈的缩血管作用,导致血管痉挛。

试验结果表明:SAH 后有 CVS 的发生;SAH 发生后有基底动脉痉挛发生且 72 h 内持续不缓解;S100B 蛋白和 ET-1 表达 72 h 内持续增加,且不受处理方法与时间的交互效应影响;S100B 蛋白和

ET-1 其后的 CVS 病理生理过程;依达拉奉的应用可减少 S100B 蛋白和 ET-1 的表达,控制血清 S100B 水平和血清 ET-1 水平的升高,使它们的水平趋于正常,保持相对平衡稳定,可有效防治 SAH 后急性 CVS 的发生。本研究证实了依达拉奉对 SAH 后急性 CVS 的有效保护作用。但对其防治作用的起始时间、最佳剂量、疗程等需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Adamczyk P, He S, Amar AP, et al. Medical management of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a review of current and emerging therapeutic interventions[J]. *Neurol Res Int*, 2013, 2013:462491.
- [2] 朱剑勇.蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的诊断和治疗[J]. *中国全科医学*, 2009, 12(16): 1510-1513.
- [3] 郑小华,曹颖平. S100B 蛋白与中枢神经系统损伤[J]. *国际脑血管病杂志*, 2008, 16(8): 625-630.
- [4] Yamashita T, Sakamoto K, Yamanishi H, et al. Effect of a free radical scavenger on nitric oxide release in microvessels[J]. *Vascul Pharmacol*, 2013, 58(1-2): 134-139.
- [5] Gules I, Satoh M, Clower BR, et al. Comparison of three rat models of cerebral vasospasm[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283(6): H2551-2559.
- [6] 肖健齐,许晶,杨福义,等.硫酸镁对蛛网膜下腔出血后急性脑血管痉挛大鼠血中一氧化氮和内皮素-1 水平的影响研究[J]. *中国全科医学*, 2010, 13(30): 3403-3405.
- [7] 杨政,吴玉林.治疗急性脑梗死的新型脑保护药依达拉奉[J]. *中国新药杂志*, 2002, 11(12): 911-913.
- [8] 汪云春,付玉.依达拉奉防治蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的临床观察[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(6): 829-830.
- [9] 邹以席,黄方炯. S100B 蛋白作为脑损伤标记物的研究进展[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2009, 23(8): 731-734.
- [10] 刘亮,尹华锦,明扬等.依达拉奉对中、重型颅脑外伤患者血清神经元特异性烯醇化酶和 S100 β 蛋白浓度的影响[J]. *中华创伤杂志*, 2011, 27(7): 583-587.
- [11] 何国美,戴薇.依达拉奉对脑梗死患者 IL-6、IL-13 及 ET-1 表达的影响[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(6): 1043-1044.
- [12] Tosaka M, Hashiba Y, Saito N, et al. Contractile responses to reactive oxygen species in the canine basilar artery in vitro: selective inhibitory effect of MCI-186, a new hydroxyl radical scavenger[J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2002, 144(12): 1305-1310.

(责任编辑:关蕴良)