

实验性大鼠脑出血后神经肽 Y 的变化 及抑肽酶的干预作用

田 力¹, 张 威², 滕伟禹³

(中国医科大学附属盛京医院 1. 干诊科, 3. 神经内科, 辽宁省沈阳市 110003;

2. 中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 神经病学; 脑出血; 神经肽 Y; 抑肽酶; 脑水肿; 大鼠

[摘要] 目的 观察大鼠脑出血后神经肽 Y 的表达与脑出血后脑含水量变化的关系, 以及抑肽酶对其的影响。方法 通过采用未抗凝新鲜自体股动脉血注入大鼠尾状核建立脑出血动物模型, 用放射免疫法测定脑出血后 6 h 和 1、3、5 及 7 天神经肽 Y 的变化, 用干重—湿重法测定脑出血后脑含水量的变化, 并与神经肽 Y 进行相关分析。结果 与对照组比较, 血肿周围组织中神经肽 Y 水平在脑出血后 1 天和 3 天时显著升高 ($P < 0.05$), 6 天时降至正常。血肿周围组织含水量在脑出血后 6 h 轻度增加, 1 天时显著增加 ($P < 0.01$), 3 天时达高峰 ($P < 0.01$), 以后逐渐下降, 7 天时基本恢复正常水平; 抑肽酶组脑含水量及神经肽 Y 含量均明显减少。结论 神经肽 Y 可能参与实验性脑出血后血肿周围水肿的形成; 抑肽酶对二者有抑制作用, 抑肽酶可能有助于减轻脑出血后脑水肿的形成。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Changes of Neuropeptide Y After Intracerebral Hemorrhagic Rats and the Intervention Effects of Aprotinin

TIAN Li¹, ZHANG Wei², and TENG Wei-Yu³

(1. Ward of Cadre, 3. Department of Neurology, the Affiliated Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110003, China; 2. Department of Neurology, the First Affiliated Clinical Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Intracerebral Hemorrhage; Neuropeptide Y; Cerebral Edema; Aprotinin; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate dynamic changes of water content and neuropeptide Y (NPY) in intracerebral hemorrhagic (ICH) rats and the role that neuropeptide Y plays in cerebral edema after hemorrhage, and to evaluate the effect of aprotinin in reducing the content of cerebral edema and neuropeptide Y. **Methods** Animal model was made by injecting self arterial blood into the caudate nucleus of rats. 75 rats were randomly assigned to control group, cerebral hemorrhage group and aprotinin treated group. After the injection, the rats were sacrificed at 6 h, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d respectively. Brain water content was determined by wet-dry weight, as the expression of neuropeptide Y was detected by radioimmunoassay method over a time course ranging from 6 hours to 7 days. **Results** Brain water content and neuropeptide Y increased after 6 hours of cerebral hemorrhage and reached its climax at the 3 days, then decreased at the 5 to the 7 days; Administration of aprotinin could reduce the content of brain edema and neuropeptide Y. **Conclusions** Aprotinin can reduce neuropeptide Y expression, thus can reduce cerebral edema after ICH. Aprotinin antagonist might be available for the therapy of cerebral edema after ICH.

对脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 后脑水肿的发生机制有多种理论, 目前研究认为多种因子通过不同的途径参与作用, 其中脑水肿在脑出血后一系列的脑损伤过程中起着关键的作用^[1,2]。因而抑制或减轻脑水肿的发生和发展是目前实验及临床工作的重点。本实验采用未抗凝新鲜自体股动脉血

建立脑出血动物模型, 动态观察脑水含量和神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 在实验性脑出血过程中的变化, 以及抑肽酶对二者的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

Wistar 大鼠, 体重 250~300 g, 雌雄不限, 由中国医科大学实验动物中心提供, 符合国家二级实验动物标准, 随机分为三组: 对照组 25 只, 经尾状核内注入生理盐水 75 μ L; ④脑出血组 25 只, 经尾状核内注入自体新鲜动脉血 75 μ L, 5 min 后注入生理盐水 3 μ L; ④抑肽酶组 25 只, 在大鼠脑出血前 30 min 按

[收稿日期] 2006-10-31 [修回日期] 2007-04-03

[基金项目] 辽宁省自然科学基金 (20051095)

[作者简介] 田力, 硕士, 主治医师, 研究方向为脑出血后脑水肿发生的机制, E-mail 为 tianliemu2@126.com。张威, 硕士, 医师, 主要研究方向为脑出血后脑水肿的发生机制。滕伟禹, 博士, 教授, 研究方向为脑出血后脑水肿的发生机制。

500 MIU/kg 腹腔注射抑肽酶, 其它操作同脑出血组。三组分别在造模后 6 h 和 1、3、5 及 7 天处死, 各时相点各处理 5 只大鼠。

1.2 动物模型制作

参照文献[3, 4]中的方法并加以改进。大鼠以 10% 水合氯醛(350 mg/kg)腹腔麻醉后, 固定于脑立体定向仪。无菌条件下头部正中纵形切口, 暴露前囟和冠状缝, 于前囟前 0.2 mm、中线右侧旁开 3 mm 处用直径 1 mm 的牙钻钻孔。用 1 mL 注射器经右侧股动脉抽取 200 μ L 自体血, 经颅骨的钻孔将注射器垂直插入脑内 6 mm(相当于尾状核的部位), 缓慢注血 75 μ L。对照组操作同实验组, 但不注血, 留针 10 min 后退针。各组动物在相应时间点经过量麻醉后断头取脑。经预实验证实模型成功的判定标准为术后沿冠状面切开脑组织可见血肿形成。

1.3 标本采集及处理

大鼠在预定时间点断头取脑, 以注血点作冠状切面, 前半用于神经肽 Y 放射免疫测定的脑组织沸水(生理盐水)中煮 5 min 使酶灭活, 以保持肽的稳定性。然后称重, 匀浆, 离心后取上清待测; 后半用于脑含水量的测定。对照组动物在术后 24 h 处死, 脑组织取样过程同实验组。

1.4 脑含水量的测定

先用电子分析天平(精确度为 0.0001 g)称取后半脑片的湿重。再将待测的脑片放入 100 $^{\circ}$ C 烤箱中, 24 h 后取出称干重, 用(湿重-干重) \div 湿重 \times 100% 计算含水量。

1.5 脑组织神经肽 Y 的测定

神经肽 Y 放射免疫试剂盒由中国人民解放军总医院科技开发中心放射免疫研究所提供, 严格按照试剂盒说明书进行操作, 并根据所示公式计算标准品及待测样品结合百分率, 在半对数坐标纸上绘制标准曲线, 最后查出样品值即 NPY 值。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验和配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用 SPSS 10.0 统计学软件。

2 结果

2.1 脑水含量变化

与对照组相比, 脑出血组出血侧 6 h 脑水含量明显升高($P < 0.05$), 3 天达到高峰($P < 0.01$), 7 天基本回至正常水平。与脑出血组相比, 抑肽酶组脑水含量明显下降($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$; 表 1)。

表 1. 各组脑含水量的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 25$)

分 组	6 h	1 天	3 天	5 天	7 天
对照组	77.72% \pm 0.64%	77.77% \pm 0.68%	77.74% \pm 0.65%	77.73% \pm 0.58%	77.74% \pm 0.59%
脑出血组	78.81% \pm 0.50% ^a	79.72% \pm 0.50% ^b	82.13% \pm 0.36% ^b	80.73% \pm 0.40% ^a	79.14% \pm 0.61%
抑肽酶组	77.68% \pm 0.31% ^d	78.24% \pm 0.18% ^d	79.51% \pm 0.44% ^d	78.42% \pm 0.21% ^c	78.03% \pm 0.30%

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与脑出血组相比。

2.2 神经肽 Y 活性的变化

与对照组相比, 脑出血组出血侧脑组织 NPY 活性 6 h 开始升高, 1~3 天达到高峰, 5 天后逐渐降

低。抑肽酶组 NPY 活性在各时相与脑出血组相比有显著性差异($P < 0.01$; 表 2)。

表 2. 各组脑组织神经肽 Y 活性的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 25$, μ g/g)

分 组	6 h	1 天	3 天	5 天	7 天
对照组	0.31 \pm 0.07	0.31 \pm 0.05	0.32 \pm 0.03	0.31 \pm 0.03	0.30 \pm 0.03
脑出血组	0.59 \pm 0.10 ^a	0.89 \pm 0.10 ^a	0.79 \pm 0.06 ^a	0.56 \pm 0.10 ^a	0.45 \pm 0.07
抑肽酶组	0.35 \pm 0.06 ^b	0.60 \pm 0.04 ^b	0.52 \pm 0.05 ^b	0.40 \pm 0.03 ^b	0.28 \pm 0.04

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与脑出血组相比。

3 讨论

神经肽 Y(NPY) 是一种含有 36 个氨基酸的多

肽, 广泛分布于中枢神经系统和外周多种组织器官中, 是缩血管活性较强的肽类物质之一。脑出血后交感神经兴奋及受损神经元释放大量 NPY 通过被

破坏血脑屏障入血液, 可使脑动脉收缩, 脑血管阻力增加, 脑灌流量减少; 脑出血后出血灶周围脑组织由于血肿压迫产生缺血半暗带即继发脑缺血改变, 而进一步加重脑缺血、缺氧。动物实验也显示, 侧脑室注射 NPY 可以使实验性大鼠中动脉栓塞大鼠脑血流量减少, 并增大了梗死面积^[5]。

本研究结果发现, 与对照组相比, 脑出血组血肿周围脑组织 NPY 活性 6 h 开始升高, 1~3 天达到高峰, 5 天后逐渐降低; 而血肿周围组织脑含水量在脑出血后 6 h 明显升高, 3 天达到高峰, 7 天基本回至正常水平。目前有研究也发现 NPY 水平与脑水肿程度呈正相关^[6]。表明 NPY 参与了脑出血的病理生理过程。脑出血后血肿对脑组织机械压迫、神经元坏死, 脑组织释放过量的 NPY, 并通过受到破坏的血脑屏障进入血液循环。

抑肽酶是从牛肺或其它组织中提取的一种碱性单链多肽。包含 58 个氨基酸残基的单链, 多肽间通过 3 个二硫键结合, 具有降低脑水肿的作用。天然的抑肽酶以其分子结构上第 15 位赖氨酸基与丝氨酸蛋白酶的活性丝氨酸基形成可逆的酶抑制物复合物而使其失活。本实验在大鼠脑出血前腹腔注射抑肽酶, 结果发现抑肽酶组脑水含量与脑出血组相比明显下降。抑肽酶降低脑水含量主要通过以下途径实现^[7-9]: 通过抑制激肽释放酶从而抑制了激肽释放酶—激肽系统的反应, 减少缓激肽生成, 改善血脑屏障的通透性, 减轻脑水肿; ④脑出血后的炎症反应加重水肿程度。抑肽酶可抑制补体的激活, 减轻炎症反应, 抑制中性粒细胞激活和脱颗粒, 保护组织细胞; ⑤抑制舒血管素及肥大细胞分泌产物的活性而减轻血管扩张及渗出; 抑肽酶所含广谱丝氨酸蛋白酶可能对凝血酶有一定的抑制作用, 从而减轻其神经毒性; 抑肽酶通过降低激肽释放酶、凝血酶和纤溶活性而保护血小板的功能, 使其免遭损耗破坏, 并减少了出血的倾向。脑出血后血脑屏障的完整性

受到破坏, 通透性增强, 抑肽酶完全可通过血脑屏障, 早期应用可减少继续出血, 缩小血肿面积, 减轻细胞毒性作用, 从而保护神经功能; 抑制激肽释放酶的激肽形成和血管活性效应, 防止缺血再灌注损伤。

研究表明脑出血后受损神经元释放大量的 NPY 通过被破坏血脑屏障入血液, 参与脑出血后一系列的病理变化, 其含量与脑水肿程度呈正相关; 抑肽酶可以减轻脑出血后的脑水肿形成。有研究认为抑肽酶能够明显减轻脑出血后血肿周围组织的细胞凋亡, 其作用机制可能与抑制 Caspase-3 的表达有关; 在脑出血早期开始应用抑肽酶可抑制纤溶酶、血管舒缓素、激肽及补体的激活, 与常规抗脑水肿药物联合使用可起到协同作用, 可为治疗出血性脑卒中的一条新途径^[8, 10]。

[参考文献]

- [1] Guohua XI, Richard F, Hoff JT. 脑出血后脑水肿的形成机制[J]. 脑血管疾病杂志, 2001, 1 (2): 99-106
- [2] Xue M, Del Bigio MR. Intracortical hemorrhage injury in rats: relationship between blood fraction and brain cell death [J]. Stroke, 2000, 31 (7): 1 721-727
- [3] Yang CY. Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats [J]. Neurosurg, 1994, 8 (11): 81-93
- [4] 张新江, 殷小平, 易黎, 张苏明, 方思羽, 卢广. 大鼠缓慢注射自体血脑出血模型[J]. 中风与神经疾病杂志, 2002, 19 (5): 299-301
- [5] Chen SH, Cheung RT. Peripheral and central administration of neuropeptide Y in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model reduces cerebral blood flow and increases infarct volume [J]. Brain Res, 2002, 927 (2): 138-143
- [6] Xu ZQ, Jiang XJ, Chen ME, Wang JZ. Alterations neuropeptide Y activity in brain tissue of rats during cerebral hemorrhage and its significance [J]. 中国临床康复, 2003, 7 (19): 2 664-665
- [7] 张彤, 李明月, 杜凤和. 药物对脑出血后脑水含量的作用[J]. 中国急救医学, 2001, 21 (2): 99
- [8] 周春奎, 吴江, 孟令秋. 抑肽酶佐治脑出血脑水肿作用机制的探讨[J]. 中华神经科杂志, 2005, 38 (1): 22-24
- [9] 刘国卿. 神经元保护剂的研究进展[J]. 药学报, 2002, 37 (8): 657-662
- [10] 杨德刚, 胡长林, 顺碧华, 许俊. 抑肽酶对脑出血后血肿周围组织细胞凋亡的干预研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 2005, 13 (3): 179-181

(此文编辑 文玉珊)