

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.15.006

文章编号: 1005-8982(2017)15-0029-05

硝普钠与尼莫地平治疗大鼠脑出血损伤的疗效 及与凝血酶受体-1 表达的相关研究

周燕利, 聂琼芳, 吴晓兰

(武汉理工大学医院 神经内科, 湖北 武汉 430010)

摘要:目的 探讨硝普钠与尼莫地平治疗大鼠脑出血(ICH),降低大鼠脑水肿及脑出血后神经元损伤的疗效及与凝血酶受体-1(PAR1)表达的相关性。**方法** 用 30 只雄性 Wista 大鼠(200~220 g)复制脑出血 ICH 模型,并随机分为 3 组(每组 10 只),分别是假手术组、脑出血组和联合治疗组。大鼠于 ICH 手术成功后 48 h 处死,收集大鼠脑组织备用。采用 TUNEL 法检测细胞凋亡的发生;干燥法检测大鼠脑组织含水量;采用免疫组织化学法和蛋白质印迹法 Western blot 检测 PAR1 蛋白的表达。**结果** 与假手术组比较,脑出血组和联合治疗组中凋亡细胞数和脑组织含水量增多(均 $P=0.000$),而联合治疗组中凋亡细胞数和脑组织含水量低于脑出血组(均 $P=0.000$);与假手术组 PAR1 蛋白含量(0.673 ± 0.121)比较,脑出血组 PAR1 蛋白含量(2.187 ± 0.233)和联合治疗组 PAR1 蛋白含量(1.434 ± 0.168)上升,差异有统计学意义($P=0.000$),与脑出血组比较,联合治疗组 PAR1 蛋白含量下降,差异有统计学意义($P=0.000$);Western blot 结果与免疫组织化学结果一致。**结论** 硝普钠与尼莫地平通过对 PAR1 的调控治疗大鼠脑出血损伤,具有神经保护作用。

关键词: 脑出血;硝普钠;尼莫地平;凝血酶受体-1

中图分类号: R743.34

文献标识码: A

Efficacy of nitroprusside and nimodipine in treatment of cerebral hemorrhage in rats and its correlation with thrombin receptor-1 expression

Yan-li Zhou, Qiong-fang Nie, Xiao-lan Wu

(Department of Neurology, Wuhan University of Technology Hospital,
Wuhan, Hubei 430010, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of sodium nitroprusside and nimodipine on cerebral hemorrhage (ICH) in rats and its correlation with expression of thrombin receptor-1 (PAR1). **Methods** Thirty male Wistar rats (200-220 g) were randomly divided into 3 groups ($n=10$ each): sham operation group, cerebral hemorrhage group and combination therapy group. Rats were sacrificed 48 hours after successful ICH operation. The apoptosis of neurons was detected by TUNEL method. The water content of brain tissue was detected. The expression of thrombin receptor-1 (PAR1) protein was detected by Immunohistochemistry and Western blot. **Results** Compared with the sham group, the number of apoptotic cells and water content in cerebral hemorrhage group and combination therapy group were significantly increased ($P=0.000$), while the number of apoptotic cells and water content of brain tissue in combination group were significantly lower than the cerebral hemorrhage group ($P=0.000$). Compared with sham group, PAR1 protein expression in cerebral hemorrhage group (2.187 ± 0.233) and PAR1 protein expression in ICH group (1.434 ± 0.168) were significantly increased (0.673 ± 0.121) ($P=0.000$). Compared with ICH group, the PAR1 protein expression in the combination group significantly decreased ($P=0.000$), and the difference was statistically significant ($P=0.000$). The results of

收稿日期: 2017-01-03

[通信作者] 吴晓兰, E-mail: 76767508@qq.com

western blot were consistent with immunohistochemical results. **Conclusions** Sodium nitroprusside and nimodipine have neuroprotective effects on cerebral hemorrhage by regulating the expression of thrombin receptor-1 (PAR1) in rats.

Keywords: cerebral hemorrhage; sodium nitroprusside; nimodipine; thrombin receptor-1

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是一种常见的神经外科疾病, 其死亡率是急性脑血管病中最高的, 严重危害人类的健康^[1]。近年研究表明, 脑出血后血肿产生的凝血酶与脑出血后的周围组织水肿、神经细胞凋亡、血脑屏障破坏及脑组织损伤等过程密切相关^[2-3]。正常生理情况下, 凝血酶通过作用于脑组织内凝血酶受体-1 (protease activated receptor-1, PAR1) 介导细胞毒性作用, 而凝血酶抑制剂可减轻脑出血后脑组织水肿及神经损伤^[4-5]。脑出血后如何调控 PAR1 的变化, 对脑出血损伤机制的研究及临床治疗具有重要的意义。硝普钠作为一种强效的周围血管扩张剂^[6], 可与尼莫地平共同作用, 改善脑血流量并促进脑细胞恢复改善脑循环^[7]。本研究旨在探讨硝普钠与尼莫地平联合作用调控 PAR1 治疗脑出血损伤的机制, 复制大鼠脑缺血 ICH 模型, 观察硝普钠与尼莫地平降低大脑血肿及改善其预后的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

一抗兔抗多克隆抗体 PAR1 (美国 Santa Cruz 生物技术有限公司), 二抗碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司), 细胞凋亡检测试剂盒、免疫组织化学二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒 (上海碧云天生物工程有限公司)。

1.2 实验动物与分组处理

30 只雄性 Wista 大鼠 (200 ~ 220)g (购于北京维通利华实验动物技术有限公司)。Wista 大鼠饲养在温度为 (22 ± 2) °C 的无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级动物实验室, 昼夜循环 12 h/12 h 光照。成功复制大鼠 ICH 模型后, 随机分为 3 组 (每组 10 只), 分别是假手术组、脑出血组和联合治疗组。硝普钠与尼莫地平在模型成功后 6 h 经腹腔注射 1.0 mg/kg (1 : 1), 每隔 12 h 注射 1 次。大鼠于 ICH 手术成功后 48 h 被处死, 收集大鼠脑组织备用。

1.3 方法

1.3.1 Rosenberg 法脑出血模型复制 称重后给予大鼠 (300 mg/kg) 腹腔注射 10% 水合氯醛, 麻醉后大鼠俯卧位于立体仪上固定。暴露大鼠颅骨并将骨膜

剥离, 用微量注射仪取大鼠自体不凝血 80 μl, 缓慢注入左侧大鼠尾状核部位, 留针 10 min 后撤针, 消毒缝合切口, 即复制 ICH 模型。假手术组不注血, 其余步骤同上。联合治疗组术后 1 h 给予腹腔注射硝普钠 (1.0 mg/kg) 与尼莫地平 (1.0 mg/kg); 脑出血组与假手术组术后 1 h 给予生理盐水腹腔注射。手术后按 Longa 5 分制标准进行评分: ①0 分, 无明显神经病学症状; ②1 分, 不能完全伸展左前肢; ③2 分, 向左侧旋转; ④3 分, 行走时向左侧倾倒; ⑤4 分, 不能自行行走, 有意识障碍。动物苏醒后, 观察缺血动物的神经功能缺失症状。累积 >1 分即为成功模型。

1.3.2 TUNEL 原位凋亡细胞检测 大鼠腹腔注射麻醉后, 依次使用生理盐水 200 ml 和 4% 多聚甲醛 200 ml 进行心脏灌注固定。脑组织常规脱水透明, 并用石蜡包埋连续切片 3 张 (8 μm/张)。①切片加入标记液恒温 37 °C 孵育 2 h, 加入生物素恒温孵育 30 min; ②链霉亲和素 - 生物素复合物试剂 37 °C 恒温孵育 30 min, 加入 DAB 显色液进行显色。切片用物镜 (× 10) (× 40) 显微镜进行观察, 细胞核中有棕黄色颗粒者视为凋亡细胞, 切片随机选择 5 个高倍镜视野, 进行凋亡细胞计数 (× 400), 平均值视为凋亡细胞数。

1.3.3 干燥法测脑组织含水量 大鼠麻醉后断头处死, 应用干湿比重法, 取大鼠前部组织立即测湿重。将组织块放入电热烘箱中 100 °C 烘烤 24 h 至恒重, 再称干重。按下列公式计算出组织含水量: 脑组织含水量 (%) = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

1.3.4 免疫组织化学法检测 PAR1 表达 制备大鼠脑组织石蜡切片, 切片用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗, 滴入 5% 血清进行 30 min 室温封闭, 切片加入 1 : 1 000 的 PAR1 一抗进行 4 °C 孵育过夜。隔天取出切片 PBS 清洗, 加入 1 : 1 000 的二抗进行 37 °C 孵育 30 min。PBS 复洗并加入霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化物酶进行 37 °C 恒温反应 30 min, 加入 DAB 显色液进行, 用物镜 (× 10) (× 40) 显微镜进行观察。阳性表达 PAR1 主要表现是细胞内出现棕黄色颗粒, 用 (× 40) 物镜显微镜观察, 随机选择 6 个高倍视野, 计算 PAR1 蛋白含量的平均光密度值 (mean optical density, MOD)。MOD = 累积光密

度与面积的比值,用于反映组织中 PAR1 蛋白含量。

1.3.5 Western blot 检测 PAR1 蛋白表达水平 取大鼠脑组织冰上裂解 2 h,离心后用 BCA 蛋白浓度(bicinchoninic acid,BCA)试剂盒进行蛋白浓度检测,将各组蛋白浓度总量调整为 $30 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。将各组蛋白样品加入到 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,转膜至聚偏二氟乙烯膜后按 1:1 000 的稀释比例加入多克隆抗体 PAR1 和二抗。用增强化学发光法显色剂显色,用 Bio-Pro 凝胶成像分析仪成像以及用 Quantity-one 软件对各泳道条带进行灰度扫描得出相应蛋白表达量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较做单因素方差分析,两两比较用 Bonferroni's Multiple Comparison Test 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经组织学评分结果

脑出血组 0 分 1 只,5 只判定为 1 分,2 只判定为 2 分,2 只判定为 3 分;联合治疗组,6 只判定为 1 分,1 只判定为 2 分,1 只判定为 3 分。3 组间秩和检验(H 检验),差异有统计学意义($H = 16.7298, P = 0.0002$)。

2.2 凋亡细胞数检测结果

假手术组仅见极少数的凋亡细胞,脑出血组和硝普钠与尼莫地平联合治疗组的凋亡细胞数量上升。假手术组脑凋亡细胞数量(3.57 ± 0.61)、脑出血组凋亡细胞数量(26.31 ± 1.27)和联合治疗组凋亡细胞数量(13.64 ± 1.31)比较,差异有统计学意义($F = 1052, P = 0.000$)。与假手术组比较,脑出血组的凋亡细胞数量增多,差异有统计学意义($t = 45.78, P = 0.000$);硝普钠与尼莫地平联合治疗组的凋亡细胞数量也增多,差异有统计学意义($t = 20.27, P = 0.000$);与脑出

血组比较,联合治疗组中的凋亡细胞数降低,差异有统计学意义($t = 25.21, P = 0.000$)。见图 1。

2.3 脑组织水含量

假手术组脑组织水含量(71.418 ± 2.254)g、脑出血组脑组织水含量(84.131 ± 1.982)g 和联合治疗组脑组织水含量(75.656 ± 1.771)g 比较,差异有统计学意义($F = 103.7, P = 0.000$)。与假手术组脑组织水含量比较,脑出血组的水含量增多,差异有统计学意义($t = 14.14, P = 0.000$);硝普钠与尼莫地平联合治疗组的水含量也增多($t = 4.718, P = 0.000$),差异有统计学意义;与脑出血组比较,联合治疗组中的水含量降低,差异有统计学意义($t = 9.424, P = 0.000$)。

2.4 各组 PAR1 蛋白含量比较

脑出血组和硝普钠与尼莫地平联合治疗组中的 PAR1 蛋白染色强度增强,大鼠脑组织中 PAR1 呈高表达状态(见图 2)。光密度结果显示,假手术组脑组织 PAR1 蛋白含量(0.673 ± 0.121)、脑出血组 PAR1 蛋白含量(2.187 ± 0.233)和联合治疗组 PAR1 蛋白含量(1.434 ± 0.168)比较,差异有统计学意义($F = 180.100, P = 0.000$)。与假手术组比较,脑出血组 PAR1 蛋白含量增多,差异有统计学意义($t = 18.980, P = 0.000$);硝普钠与尼莫地平联合治疗组 PAR1 蛋白含量也增多,差异有统计学意义($t = 9.490, P = 0.000$)。与脑出血组比较,联合治疗组 PAR1 蛋白含量下降,差异有统计学意义($t = 9.490, P = 0.000$)。

2.5 各组的 PAR1 蛋白表达量比较

Western blot 分析显示,假手术组脑组织 PAR1 蛋白表达量(0.943 ± 0.448)、脑出血组 PAR1 蛋白含量(2.311 ± 0.547)和联合治疗组 PAR1 蛋白含表达量(1.627 ± 0.493)比较,差异有统计学意义($F = 18.89, P = 0.000$)。与假手术组比较,脑出血组 PAR1 蛋白表达量增多,差异有统计学意义($t = 6.147, P = 0.000$);硝普钠与尼莫地平联合治疗组 PAR1 蛋白表达量也增多,差异有统计学意义($t = 3.037, P = 0.000$)。与脑

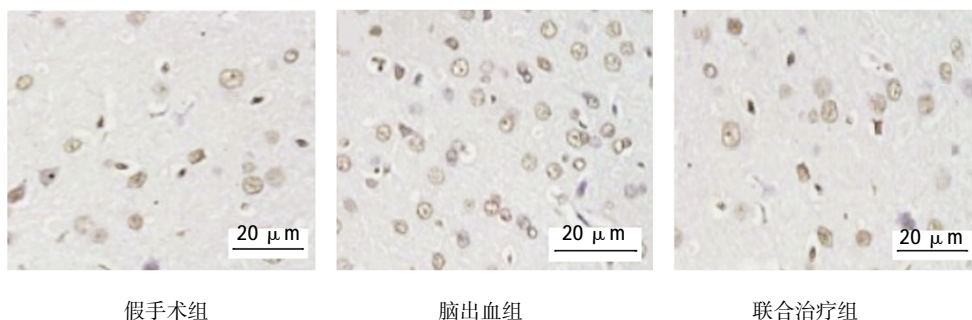


图 1 各组的凋亡细胞数 ($\times 400$)

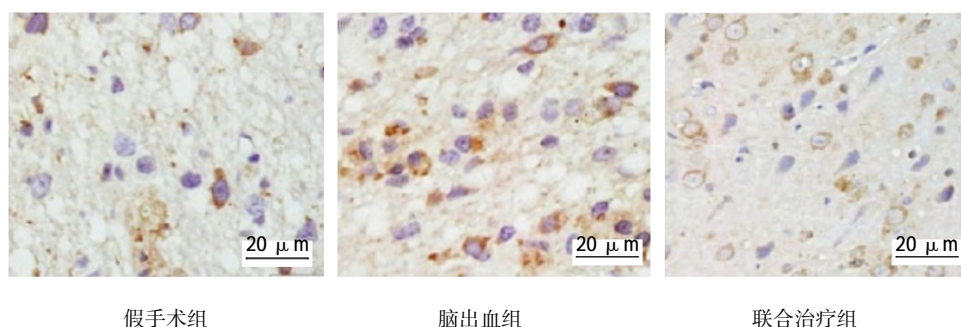
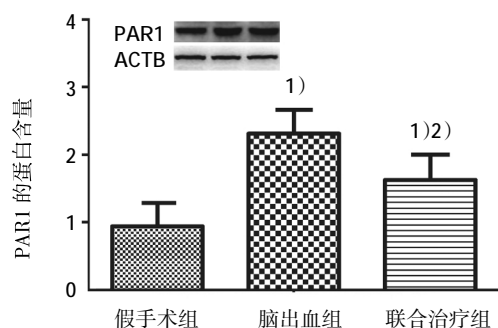


图 2 各组的 PAR1 蛋白含量 (×400)

出血组比较,联合治疗组 PAR1 蛋白含量降低,差异有统计学意义($t=3.037, P=0.000$)。见图3。



1)与假手术组比较,脑出血组和联合治疗组的 PAR1 蛋白含量增高($P=0.000$);2)与脑出血组比较,联合治疗组的 PAR1 蛋白含量下降($P=0.000$)

图 3 各组的 PAR1 蛋白表达量变化

3 讨论

脑出血具有高发病率、高致残率及高死亡率的特点,严重危害人类的健康^[1,8]。脑出血后血肿产生的凝血酶及 PAR1 与脑组织周围的继发性损伤密切相关^[2-3]。硝普钠是一种速效、短时的血管扩张药^[9],对动脉和静脉的平滑肌有扩张作用,减轻周围血管阻力,是治疗脑出血的首选药物之一^[10-12];尼莫地平作为钙离子拮抗剂,可透过血脑屏障、减轻脑细胞钙超载,使血肿周围血流量和血管性水肿减轻^[13-14]。研究表明硝普钠与尼莫地平对颅脑损伤脑功能恢复均有明显的疗效^[15-16]。

本研究旨在探讨硝普钠与尼莫地平联合作用调控 PAR1 治疗脑出血损伤的机制。研究结果显示,与假手术组比较,脑出血组和硝普钠与尼莫地平联合治疗组的凋亡细胞数及脑组织含水量增加,表明大鼠脑出血脑水肿模型复制成功,发生细胞凋亡;联合治疗组中的凋亡细胞数及脑组织含水量低于脑出血组,说明脑出血后给予硝普钠与尼莫地平可有效缓解脑

出血损伤,减少细胞凋亡。免疫组织化学检测 PAR1 蛋白含量可知,脑出血后 PAR1 的含量上升,调控脑组织血流量及水肿的变化;同时发现,硝普钠与尼莫地平的联合使用可有效降低 PAR1 蛋白含量,有效作用于凝血酶受体来缓解脑出血损伤。

综上所述,硝普钠与尼莫地平可以通过调节 PAR1 产生抗细胞凋亡作用,降低大脑血肿及改善神经损伤,这对于临床治疗脑出血水肿、缓解神经元损伤具有重要的意义。

参 考 文 献:

- [1] 刘育进,尹泽黎,龚细礼,等.脑出血后血肿局部凝血酶与脑水肿、神经功能缺损相关性的临床研究[J].湖南师范大学学报(医学版),2011,8(4):34-40.
- [2] 张青,蒋艳霞,李国良,等.醒脑静合生脉注射液对大鼠脑出血后凝血酶受体-1表达的影响[J].解剖学报,2013,44(5):630-634.
- [3] 王珑,邹伟,李丹,等.针刺对实验性脑出血大鼠脑组织 PAR-1 表达的影响[J].针灸临床杂志,2010,26(2):44-51.
- [4] LI Y, YANG W, QUINONES-HINOJOSA A, et al. Interference with protease-activated receptor 1 alleviates neuronal cell death induced by lipopolysaccharide-stimulated microglial cells through the PI3K/Akt pathway[J]. Sci Rep, 2016, 2(6): 38247.
- [5] GERA O, SHAVIT-STEIN E, BUSHI D, et al. Thrombin and protein C pathway in peripheral nerve schwann cells[J]. Neuroscience, 2016, 17(339): 587-598.
- [6] 曹鹏,梁勇,潘东升,等.脑室内注射硝普钠防治动脉瘤性蛛网膜下腔出血术后脑血管痉挛的疗效分析[J].中国微侵袭神经外科杂志,2013,18(3):104-106.
- [7] 吴静,李莉,周秀成,等.尼莫地平静脉泵入治疗高血压性脑出血 20 例[J].中国药业,2014,23(21):112-113.
- [8] ZHANG C, LEE J Y, KEEP R F, et al. Brain edema formation and complement activation in a rat model of subarachnoid hemorrhage[J]. Acta Neurochir Suppl, 2013(118): 157-161.
- [9] 徐小琳,俞万香.硝普钠早期积极降压治疗高血压性脑出血的疗效观察[J].汕头大学医学院学报,2015,28(1):33-35.
- [10] 祝丽丽.硝普钠静脉泵入治疗高血压性脑出血的效果观察及护理[J].海峡药学,2015,27(12):138-139.

- [11] KOLAR M, NOHEJLOVA K, MARES J, et al. Early changes of brain perfusion after subarachnoid hemorrhage the effect of sodium nitroprusside[J]. *Physiol Res*, 2016, 22(65): S591-S599.
- [12] 李元斌, 邓发斌, 陈淳, 等. 微泵输注丙泊酚和硝普钠在脑出血急性期的镇静强化降压的疗效观察[J]. *安徽医药*, 2013, 17(3): 495-497.
- [13] HELBOK R, ZANGERLE A, CHEMELLI A, et al. Continuous intra-arterial nimodipine infusion in refractory symptomatic vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 1807.
- [14] 杨静, 李世平, 李震中. 尼莫地平注射液对脑出血急性期患者高血压调控的体会[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2013, 21(3): 224-226.
- [15] 胡鸿和, 陈克勤. 两种药物治疗高血压性脑出血的比较研究[J]. *中国现代医生*, 2010, 48(5): 113-114.
- [16] 钟波, 刘艳红, 田烜. 立体定向血肿穿刺抽吸术联合醒脑静注射液治疗高血压脑出血的临床研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(4): 60-63.

欢迎订阅《中国现代医学杂志》

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年,是一本医学综合性学术期刊。由中华人民共和国教育部主管,中南大学湘雅医院承办。创刊以来始终坚持以服务广大医药卫生科技人员、促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨,密切关注世界医学发展的新趋势,积极推广国内医药卫生领域的新技术、新成果,及时交流广大医药卫生人员的医学科学理论和业务技术水平,成为国内外医学学术交流的重要园地,已进入国内外多个重要检索系统和大型数据库。如:中文核心期刊(中文核心期刊要目总览 2008、2011 和 2014 版)、中国科技论文与引文数据库即中国科技论文统计源期刊(CSTPCD)、俄罗斯文摘(AJ)、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网全文数据库(CNKI)、中文科技期刊数据库、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、超星“域出版”及中国生物医学期刊光盘版等。

《中国现代医学杂志》辟有基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。主要刊登国内外临床医学、基础医学、预防医学以及医学相关学科的新理论、新技术、新成果,以及医院医疗、教学、科研、管理最新信息、动态等内容。主要读者为广大医药卫生科技人员。

《中国现代医学杂志》为旬刊(2017 年 7 月开始),国际标准开本(A4 幅面),全刊为彩色印刷,无线胶装。内芯采用 90 g 芬欧汇川雅光纸(880×1230 mm),封面采用 200 g 紫鑫特规双面铜版纸(635×965 mm)印刷,每个月 10、20 和 30 日出版。定价 25 元/册,全年 900 元。公开发行,国内统一刊号:CN 43-1225/R;国际标准刊号:ISSN 1005-8982;国内邮发代号:42-143。欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅,漏订或需增订者也可直接与本刊发行部联系订阅。联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国现代医学杂志》发行部,邮编:410008。

电话:0731-84327938;传真:0731-89753837;E-mail:xdyx99@126.com

唯一官网网址:www.zgxdyx.com

《中国现代医学杂志》编辑部