

论著 · 基础研究

高压氧对急性脑出血大鼠血浆降钙素基因相关肽及内皮素的影响

郑 波

(荆州市中心医院神经外科,湖北荆州 434020)

摘 要:**目的** 探讨高压氧对急性脑出血大鼠血浆降钙素基因相关肽及内皮素的影响。**方法** 将大鼠分为正常组、急性脑出血组(分为脑出血后 4、24、48 h 亚组)、高压氧治疗组(分为脑出血后 4、24、48 h 亚组)。除正常组外,其他各组大鼠建立急性脑出血大鼠模型,对比观察高压氧对急性脑出血大鼠血浆降钙素基因相关肽及内皮素的影响。**结果** 急性脑出血后,血浆及出血皮层内皮素在出血后 4、24、48 h 亚组的水平较正常组大鼠明显增高,其中出血后 24 h 亚组水平最高;血浆中降钙素基因相关肽在 4、24、48 h 亚组的水平较正常组大鼠明显降低,且 48 h 亚组水平最低;急性脑出血大鼠经高压氧治疗后 4、24、48 h 各亚组血浆及出血皮层内皮素水平与相应急性脑出血组相比均显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$);降钙素基因相关肽水平与相应急性脑出血组相比均显著增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 对于急性脑出血引起的内皮素升高及血浆降钙素基因相关肽降低,高压氧有治疗作用。

关键词: 高压氧; 脑出血; 血浆降钙素基因相关肽; 内皮素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.10.007 **中图法分类号:**R743.3

文章编号:1673-4130(2018)10-1180-04 **文献标识码:**A

Effects of hyperbaric oxygen on plasma calcitonin gene-related peptide and endothelin
in rats with acute cerebral hemorrhage

ZHENG Bo

(Department of Neurosurgery, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou, Hubei 434020, China)

Abstract:**Objective** To investigate the effects of hyperbaric oxygen (HBO) on plasma calcitonin gene-related peptide and endothelin in rats with acute cerebral hemorrhage. **Methods** 56 rats were randomly divided into normal group, acute cerebral hemorrhage group (divided into groups of 4, 24, 48 h groups after cerebral hemorrhage) and hyperbaric oxygen treatment group (divided into groups of 4, 24 and 48 h group after cerebral hemorrhage). In addition to the normal group, other rats in each group were treated with in an acute cerebral hemorrhage model. The effects of HBO on plasma calcitonin gene-related peptide and endothelin in rats with acute cerebral hemorrhage were observed and compared. **Results** After acute cerebral hemorrhage, the levels of plasma and hemorrhage cortical endothelin in subgroups of 4, 24, 48 h after endothelin were significantly higher than those in the normal group, and the level of the 24 h of the nemorrhage group was the highest. The levels of calcitonin gene-related peptide in plasma and hemorrhagic cortex decreased significantly in 4, 24 and 48 h groups compared with the normal group, and the level in the 48 h group was the lowest. After hyperbaric oxygen therapy, the levels of plasma and cerebral hemorrhage in the 4, 24 and 48 h groups were significantly lower than those in the corresponding cerebral hemorrhage group, and differences were statistically significant ($P<0.05$); calcitonin gene gene-related peptide and cerebral hemorrhage were significantly higher than those in the corresponding cerebral hemorrhage group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Hyperbaric oxygen has a therapeutic effect on the elevation of endothelin and the decrease of calcitonin gene-related peptide in patients with acute cerebral hemorrhage.

Key words: hyperbaric oxygen; cerebral hemorrhage; plasma calcitonin gene-related peptide; endothelin

脑出血指原发性脑实质内的出血,是中老年人常见的急性脑血管病,有很高的发病率、致残率和病死率。脑出血后引起的病理生理过程复杂^[1],包括血肿的占位损伤和血肿周围脑组织继发缺血引起的神经

损伤^[2]。此外,脑水肿、DNA 氧化损伤导致脑细胞坏死和凋亡等^[3-4]。传统的治疗方法以手术和药物为主,患者预后不理想。但随着高压氧疗法应用于脑出血、脑水肿等中枢神经系统疾病的临床治疗,不仅能

作者简介:郑波,男,主治医师,主要从事神经外科疾病研究。
本文引用格式:郑波. 高压氧对急性脑出血大鼠血浆降钙素基因相关肽及内皮素的影响[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(10):1180-1183.

消除水肿,而且能改善患者的神经恢复情况,提高预后效果^[5-7]。但国内外关于高压氧对急性脑出血的治疗研究较少,所以本实验采用高压氧治疗急性脑出血大鼠,并观察高压氧对急性脑出血大鼠血浆降钙素基因相关肽(CGRP)及内皮素(ET)的影响,为临床安全应用高压氧治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 56 只,平均体重(200±25)g,8~10 周龄,由陕西省医学实验动物中心供给,动物合格证号:SCXK(陕)2012-003。将大鼠随机分为急性脑出血组(分为脑出血后 4、24、48 h 亚组)、高压氧治疗组(分为治疗后 4、24、48 h 亚组),以及正常组,每组 8 只。

1.2 实验器材 脑立体定向仪(江湾 I 型 C);涡轮牙钻机(北京自动化仪表三厂提供);动物实验氧舱(陕西中心供氧);CY-4 型测氧仪(浙江新安江分析仪器厂提供);LD24-0.8 自动平衡微型离心机(上海精密仪器制造厂微型离心机);电热恒温水温箱(上海医疗器械七厂);氮氧混合气中氧浓度约为 8.4%;上钢五厂气体公司提供医用纯氧(纯度 99.2%)。

1.3 方法

1.3.1 制备急性脑出血模型 经腹腔注射 10%水合氯醛(400 mg/kg)麻醉大鼠,然后将其置于恒温垫上维持肛温 37.5℃,同时将大鼠俯卧位稳定在脑立体定向仪上,前囟比后囟高 1.2 mm,用 75%乙醇给头背侧皮肤消毒,在耳朵与眼睛之间做一纵向切口,暴露颅骨,用棉签擦开软组织,确定前囟^[8],在矢状缝向右 3.2 mm,前囟后 1.4 mm,用牙科钻钻一直径为 1 mm 的圆孔,以微量注射器笔直进针 5.6 mm,定位于苍白球内,脑立体定向仪笔直位固定一微量注射器,使针头与牙科钻孔的方向在一条直线上,稳固好立体定向仪,取下微量注射器(留下针头)。将大鼠双下肢翻转朝上固定,尾根部腹侧暴露,消毒后在腹侧正中做一纵行切口,长 2~3 mm,手术分离暴露大鼠尾动脉,在尾动脉下垫一手术刀柄,使动脉放于刀柄上,用盐水冲洗过的微量注射器穿刺尾动脉,抽取不加抗凝剂的动脉血液 60~70 mL。迅速将微量注射器通过牙科钻孔垂直缓慢进入脑内,缓慢注入 50 mL 自体动脉血液,2 min 缓慢地将溶液匀速注射完,留针 5 min,退 0.5 mm,再留针 5 min 后缓慢拔出针头,棉球清理干净手术切口,缝合皮肤并消毒^[9]。

1.3.2 动物分组处理 正常组:置于加压舱内仿照除压力和氧浓度外的其他实验过程和环境条件,出舱后察看 1 h 后断头。急性脑出血组:急性脑出血后置于加压舱内仿照除压力和氧浓度外的其他实验,并分别于伤后 4、24、48 h 断头。高压氧治疗组:大鼠急性脑出血 1 h 后将大鼠置于提前放有新鲜钠石灰的动物加压舱内用纯氧气舱 10 min 使舱内氧浓度大于 98%,以 0.1 MPa/min 的速度加压至 0.25 MPa,在高压下停留 1 h,中间间断用纯氧通风换气 10 min,使舱

内氧浓度维持在 96.3%以上,停留结束后 10 min 内匀速减压至常压出舱,舱内温度维持 22~24℃。正常组及急性脑出血组大鼠亦置于加压舱内,仿照除压力和氧浓度外的其他实验过程和环境条件并分别于颅脑出血后 4、24、48 h 断头^[10]。

1.3.3 样本收集 各组大鼠在安静状态下迅速断头取主动脉血 2 mL,注入含 0.3 mol/L 乙二胺四乙酸二钠 40 μL 和抑肽酶 1 000 U 的试管中,混匀,4℃,3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆,取上清,放置-20℃保管待测。大鼠断头后,取脑出血侧大脑半球,浸入 4%福尔马林溶液内固定,待用。

1.4 测定 将待测样本于冷水中复融,再次 4℃,1 000 r/min 离心 5 min,采用非平衡法,取上清液分别测定 ET 和 CGRP 的水平。此外,取出浸泡在福尔马林溶液内的大脑皮质组织,做成常规石蜡切片,并做连续冠状切片,切片厚度 4 μm,标记编号,完全晾干后,进行烤片,脱蜡。组织切片后进行组织学检查。

1.5 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件对数据进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$,组间比较采用单因素方差分析,用 *t* 检验,计量资料采用 χ^2 检验,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆及出血皮层 ET 水平在急性脑出血前后的变化 大鼠急性脑出血后,血浆及出血皮层出血后 4、24、48 h ET 水平均显著高于正常组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。其中脑出血后 24 h 组血浆及出血皮层 ET 水平最高,分别为(116.53±37.89)ng/L 和(2.49±0.57)pg/mg,差异具有统计学意义(*P*<0.01)。见表 1。

2.2 血浆及出血皮层 CGRP 水平在急性脑出血前后的变化 脑出血 4、24、48 h 各组大鼠血浆及出血皮层 CGRP 水平显著低于正常组,差异具有统计学意义(*P*<0.01)。脑出血后 48 h 组出血皮层 CGRP 水平最低,为(9.47±4.37)pg/mg,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

2.3 高压氧对急性脑出血大鼠血浆及出血皮层 ET 水平的影响 急性脑出血大鼠经高压氧治疗后 4、24、48 h 各组血浆及出血皮层 ET 水平与相应急性脑出血组相比有明显降低,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 3。

表 1 急性脑出血后血浆和出血皮层中 ET 水平的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	血浆(ng/L)	出血皮层(pg/mg)
正常组	77.68±17.58	1.57±0.73
脑出血后 4 h 组	112.78±21.67*	2.38±0.48*
脑出血后 24 h 组	116.53±37.89#	2.49±0.57#
脑出血后 48 h 组	95.78±13.03#	1.98±0.36#

注:与正常组比较,**P*<0.01;与正常组比较,#*P*<0.05

2.4 高压氧对急性脑出血大鼠血浆及皮层 CGRP 含

量的作用 急性脑出血大鼠经高压氧治疗后 4、24、48 h 各组血浆及出血皮层 CGRP 含量与相应脑出血对照组比较有显著的提高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。而 48 h 组血浆及出血皮层 CGRP 含量最高但与正常组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

2.5 各组大鼠皮层组织石蜡切片 正常大鼠脑组织皮质的切片图无异常显示;而无论是急性脑出血大鼠脑组织皮层切片图还是高压氧治疗后的急性脑出血大鼠脑组织皮层切片图,在一定程度上都显示有异

常。见图 1。

表 2 急性脑出血后血浆和出血皮层中 CGRP 浓度的变化($\bar{x}\pm s$)		
组别	血浆 (ng/L)	出血皮层 (pg/mg)
正常组	384.35±89.45	19.93±6.73
脑出血后 4 h 组	210.28±41.35 [*]	14.84±2.47 [*]
脑出血后 24 h 组	215.56±91.38 [#]	10.78±2.86 [#]
脑出血后 48 h 组	265.89±42.75 [#]	9.47±4.37 [#]

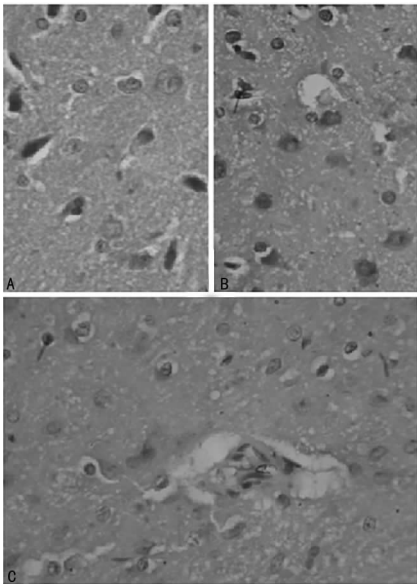
注:与正常组比较,^{*} $P<0.01$;与正常组比较,[#] $P<0.05$

表 3 高压氧对急性脑出血大鼠血浆及出血皮层 ET 水平的影响($\bar{x}\pm s$)						
样本	急性脑出血组			高压氧治疗组		
	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
血浆(ng/L)	117.45±19.65	112.65±33.46	96.27±11.19	65.32±25.32 [#]	74.63±20.45 [#]	63.42±15.37 [#]
出血皮层(pg/mg)	2.47±0.52	2.57±0.61	1.89±0.41	1.32±0.43 [*]	1.62±0.48 [*]	1.21±0.41 [*]

注:与急性脑出血组出血皮层比较,^{*} $P<0.01$;与急性脑出血组血浆比较,[#] $P<0.05$

表 4 高压氧对急性脑出血大鼠血浆及出血皮层 CGRP 水平的影响($\bar{x}\pm s$)						
样本	急性脑出血组			高压氧治疗组		
	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
血浆(ng/L)	218.32±39.42	211.26±69.32	265.45±41.35	275.65±51.23 [#]	342.35±41.26 [#]	431.45±40.35 [#]
出血皮层(pg/mg)	10.12±2.32	11.32±4.42	12.65±2.13	13.35±1.86 [*]	14.35±2.35 [*]	20.35±2.36 [*]

注:与急性脑出血组出血皮层比较,^{*} $P<0.01$;与急性脑出血组血浆比较,[#] $P<0.05$



注:A 为正常大鼠脑组织皮层切片图;B 为急性脑出血大鼠脑组织皮层切片图(神经细胞水肿,出现空泡,包膜不完整,核固缩);C 为高压氧治疗后的急性脑出血大鼠脑组织皮层切片图(神经细胞水肿减轻,形态变化基本恢复正常,细胞间隙变小)

图 1 大鼠脑组织皮层切片图

3 讨 论

ET 是作用最长效的血管收缩剂,是机体在病理状态下产生的内源性损伤因子,急性脑出血时 ET 水平会显著升高^[11-13]。而 CGRP 在体内有显著的舒张血管的作用,主要分布于神经和脑血管系统,对脑血

管功能的调节有重要作用。研究发现静脉滴注 CGRP 可降低血浆 ET 水平^[14],说明 CGRP 对 ET 具有拮抗作用,为内源性的 ET 拮抗剂。急性脑出血导致局部脑组织缺血、缺氧,甚至神经细胞水肿、坏死,而高压氧因其氧含量高被应用于急性脑出血的治疗,并取得了一定的效果^[15]。因此,通过研究 ET 和 CGRP 在急性脑出血时的表达水平,对分析高压氧治疗急性脑出血的临床作用有重要意义。

本研究结果显示,在急性脑出血后 4、24、48 h,大鼠血浆及出血皮层 ET 水平较正常组有明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),且出血后 24 h 组 ET 表达水平最高,与组织形态学的变化一致,考虑可能与 ET 的强烈缩血管作用并导致组织的缺血、缺氧而造成的神经细胞损伤有关。而急性脑出血后 4、24、48 h 后大鼠血浆及出血皮层 CGRP 水平均较正常组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),且持续降低。此结果证明 ET 与 CGRP 参与了急性脑出血的病理生理过程,因此,急性脑出血后血浆 ET 和 CGRP 的表达水平能够反映脑组织的损伤程度。

脑出血后血浆和皮层 ET 的升高及 CGRP 的降低使脑血管舒张和收缩的调节、脑血流量的自身调节失衡,造成脑组织血流量及供氧减少,进一步加重了脑组织损伤^[16-17]。实验发现急性脑出血后高压氧治疗可以明显升高血浆及出血皮层 CGRP 水平,同时使血浆及出血皮层 ET 水平显著降低。其机制为:(1)缺

氧是诱发 ET 合成的一个重要环节,同时缺氧又可能导致 CGRP 释放的减少^[18],高压氧可以纠正组织的缺氧从而抑制 ET 的合成并促进 CGRP 的释放。(2)高压氧可抑制 ET 升高所致神经细胞突触对氨基酸的兴奋性和神经毒性的反应^[7]。(3)高压氧可以增加脑缺血区域血流,降低脑水肿程度和代谢率,减少兴奋性氨基酸的产生和钙内流,并清除自由基。(4)缺氧可以导致血管对 CGRP 的反应性下降,而高压氧通过纠正缺氧可以提高血管对 CGRP 的反应性,改善组织的血供。笔者认为高压氧可以抑制缺血的脑血管平滑肌 Ca^{2+} 内流,对抗 ET 的血管收缩,阻断其加重脑缺血缺氧的恶性循环,从而减少 ET 合成与分泌的增加,使缺血脑组织 ET 水平降低,同时高压氧可刺激组织细胞释放大量的 CGRP 进入血液循环,对脑血管的调节起到保护作用。

综上所述,高压氧对急性脑出血引起的 ET 升高及 CGRP 的降低有显著的作用,是治疗急性脑出血的有效方法。

参考文献

- [1] XING YINGQI, HUA Y A, KEEP R F, et al. Effects of deferoxamine on brain injury after transient focal cerebral ischemia in rats with hyperglycemia[J]. Brain Res, 2009, 1291(4):113-121.
- [2] FAINARDI E, BORRELLI M, SALETTI A, et al. CT perfusion mapping of hemodynamic disturbances associated to acute spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. Neuroradiology, 2008, 50(8):729-740.
- [3] ZHANG X J, LI H Y, HU S C, et al. Brain edema after intracerebral hemorrhage in rats; the role of inflammation[J]. Neurol India, 2006, 54(4):402-407.
- [4] SWANN K, BERGER J, SPRAGUE S M, et al. Peripheral thermal injury causes blood-brain barrier dysfunction and matrix metalloproteinase (MMP) expression in rat[J]. Brain Res, 2007, 1129(1):26-33.
- [5] AVRAHAM-LUBIN B C, DRATVIMAN-STOROBINSKY O, EL S D, et al. Neuroprotective effect of hyperbaric Oxygen therapy on anterior ischemic optic neuropathy[J]. Front Neurol, 2011, 2:23.
- [6] XU Y, JI R J, WEI R L, et al. The efficacy of hyperbaric oxygen therapy on middle cerebral artery occlusion in animal studies: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2016, 11(2):e0148324.
- [7] HELMS A, EVANS A W, CHU J, et al. Hyperbaric Oxygen for neurologic indications action plan for multicenter

- trials in: stroke, traumatic brain injury, r-adiation encephalopathy and status migrainosus[J]. Undersea Hyperb Med, 2011, 38(5):309-319.
- [8] TUAL-CHALOT S, GUIBERT C, MULLER B, et al. Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(2):261-268.
- [9] 韩伟一, 陈涛利, 陶英群. 大鼠自体动脉血脑出血模型的改良[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(19):5407-5408.
- [10] 于涛. 高压氧对急性颅脑损伤大鼠内皮素及降钙素基因相关肽作用的研究[M]. 上海: 第二军医大学, 2002:70-73.
- [11] EFTEKHARI S, EDVINSSON L. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its receptor components in human and rat spinal trigeminal nucleus and spinal cord at C1 level[J]. BMC Neurosci, 2011, 12(1):112.
- [12] LIANG Z L, ZHANG L, WANG X C, et al. Distribution and neurochemical features of neuronal nitric oxide synthase-expressing interneurons in the rat dentate gyrus[J]. Brain Res, 2013, 1505(6):11-21.
- [13] VILOTTI S, VANA N, VAN DEN MAAGDENBERG A M, et al. Expression and function of calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in trigeminal ganglia of R192Q Ca α 1 knockin mice[J]. Neurosci Lett, 2016, 620(1):104-110.
- [14] SEHBA F A, PLUTA R M, MACDONALD R L. Brain injury after transient global cerebral ischemia and subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke Res Treat, 2013, 2013:827154.
- [15] 牛蕾蕾, 李红玲, 陈玉燕, 等. 不同介入时间高压氧治疗对实验性脑出血大鼠出血灶周围水肿及水通道蛋白-4 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2014, 29(9):810-815.
- [16] 徐洁, 许庆成, 周俊山. 缺血性脑卒中患者血浆内皮素和血浆降钙素基因相关肽的研究[J]. 临床神经病学杂志, 2000, 13(1):37-38.
- [17] YIN H L, LUO C W, DAI Z K, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α , vascular endothelial growth factor, inducible nitric oxide synthase, and endothelin-1 expression correlates with angiogenesis in congenital heart disease[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2016, 32(7):348-355.
- [18] GANESH D, KUMARATHASAN P, THOMSON E M, et al. Impact of superoxide dismutase mimetic AEOL 10150 on the endothelin system of fischer 344 rats[J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0151810.

(收稿日期:2017-09-14 修回日期:2017-11-04)