

由肝脏等器官大量产生^[2]。近年来研究提示,PCT 已被公认为评价细菌感染的一个良好的指标,尤其在全身炎症反应综合征、脓毒血症等诊断方面具有重要的意义^[3]。在临床工作中,PCT 已与 WBC 总数、CRP、ESR 等传统炎性指标在判断细菌感染方面具有相同重要的价值。由于其持续时间较长,并且 PCT 值随病情而变化,因此,在某种程度上,PCT 在判断细菌感染方面优于上述传统的炎性指标。近年来研究发现,PCT 在结缔组织疾病如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎等疾病中也存在异常^[4]。

川崎病被认为是与感染和免疫有关的一类疾病,其急性期血液中 WBC 总数、CRP、ESR 等炎性指标存在明显异常^[5]。有关川崎病时 PCT 血浆浓度变化的研究已有报道,但结论相差较大。有研究提示川崎病时 PCT 正常,但也有研究提示川崎病时 PCT 明显增高^[6,7]。笔者的研究结果提示,PCT 在半数川崎病患者中增高,半数正常,它的变化不如 WBC、CRP、ESR 敏感,其在川崎病诊断中的地位低于传统的 WBC 总数、CRP、ESR 等炎性指标。笔者对所有住院的川崎病患者均于入院当天行血培养细菌检查,均未检出致病菌,提示川崎病并非细菌感染所致。

川崎病时 CA 损害是多种炎性因子作用于血管内皮细胞,使内皮细胞损伤所致。笔者对本组 37 例 CA 损害的川崎病患者研究表明,CA 损害组血浆中 WBC 总数、CRP、ESR 与 CA 正常组比较,二组间无显著性差异,提示川崎病患者血浆 WBC 总数、CRP、ESR 不是预测 CA 损害的有效指标。对 CA 损害组 PCT 研究表明,CA 损害组 PCT 阳性率(43%)甚至低于 CA 正常组(51%),经统计学分析无显著性差异。

但 CA 损害组异常 PCT 平均值则显著高于 CA 正常组,提示对于川崎病患者血浆 PCT 异常增高者应引起足够的重视。国外有研究认为,PCT 与 CA 损害有关^[7]。目前临床上虽然尚无有效的指标预测 CA 损害的发生,但早期静脉应用大剂量的丙种球蛋白已被公认为预防 CA 损害的有效手段^[8]。

综上所述,PCT 作为一个新的炎性指标,其在脓毒血症、感染性休克等细菌感染的诊断中具有重要意义,但在川崎病中则变化较大,它的敏感度低于 WBC 总数、CRP、ESR 等传统的炎性指标,故 PCT 不是诊断川崎病的主要有效指标。PCT 也不能预测 CA 损害,但临床医生应重视川崎病患者血浆异常增高的 PCT。

参考文献

- 1 胡亚美,江载芳.诸福棠实用儿科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2010:698-705
- 2 Meisner M. Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin[J]. Clin Chim Acta,2002,323(122):17-29
- 3 Gendrel D, Bohuon C. Procalcitonin as a marker of bacterial infection[J]. Pediatr Infect Dis J,2000,19(8):679-687
- 4 Seire CA, Capotoli R, Perotti C, et al. Plasma procalcitonin in rheumatic diseases[J]. Reumatismo,2003,55(2):113-118
- 5 Shulman ST, Rowley AH. Advances in Kawasaki disease[J]. Eur J Pediatr,2004,163:285-291
- 6 龚敏,张伟利.川崎病患者血中降钙素原的观察[J].上海医学,2001,24(11):688-689
- 7 Okada Y, Minakami H, Tomomasa T, et al. Serum procalcitonin concentration in patients with Kawasaki disease[J]. J Infect,2004,48(2):199-205
- 8 黄国英.川崎病丙种球蛋白治疗策略[J].儿科药理学杂志,2011,17(2):1

(收稿日期:2012-05-06)

(修回日期:2012-06-04)

人组织激肽释放酶对兔症状性脑血管痉挛后脑氧自由基的影响

莫云长 耿武军 戴勤学 王宏法 王均炉

摘要 目的 探讨人组织激肽释放酶(HTK)对兔症状性脑血管痉挛的脑氧自由基代谢影响。**方法** 双侧颈总动脉结扎后无神经症状日本大耳白兔 24 只,随机分为 3 组($n=8$):即假手术(Sham)组、蛛网膜下腔出血(SAH)组、人组织激肽释放酶

基金项目:浙江省科技计划基金资助项目(2008C33037)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院麻醉科

通讯作者:王均炉,电子信箱:wangjunlu@yahoo.com.cn

(HTK)组:SAH+静脉滴注 $\text{HTK} 10 \times 10^{-3} \text{PNAU/kg}$,连续静脉给药 5 天。每组兔子注血前后每日进行神经功能评分,分别在第 1 次注血前 1 天(D0)及后第 5 天(D5)行 3D-CTA 造影,并在最后一次造影后取新鲜海马组织进行 SOD、MDA 检测。结果 与 Sham 组比较,SAH 组兔基底动脉在 SAH 后 5 天痉挛明显($P < 0.05$),神经功能评分明显升高;与 SAH 组相比,HTK 组在 D5 时兔基底动脉直径增粗($P < 0.05$),神经功能评分降低。海马组织 SOD、MDA 测定:与 SAH 组相比,HTK 组 SOD 活性较高($P < 0.05$),与 SAH 组相比,HTK 组 MDA 含量则较低($P < 0.05$)。结论 人组织激肽释放酶能扩张痉挛的基底动脉,并通过调节氧自由基水平起到脑保护作用。

关键词 脑血管痉挛 氧自由基 人组织激肽释放酶 兔

Effects of Human Tissue Kallikrein on Cerebral Oxygen Radical in Rabbit with Symptomatic Cerebral Vasospasm. Mo Yunchang, Geng Wujun, Dai Qinxue, et al. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Wen Zhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the effects of the human tissue kallikrein on cerebral oxygen free radical metabolism in the cerebral vasospasm rabbits. **Methods** Twenty four Japanese white rabbits with ligation of bilateral common carotid arteries and no neurological deficits were randomized into sham-operation (Sham) group, subarachnoid hemorrhage (SAH) group and human tissue kallikrein (HTK) group. These rabbits were injected of $\text{HTK} 10 \times 10^{-3} \text{PNAU/kg}$, continuous vein administration 5 days. The neurological scores were observed everyday and cerebral angiography changes were measured twice by 3D-CTA, and hippocampus was removed for detection of MDA and SOD after last CTA examination. **Results** In SAH group, the basilar artery were significantly vasoconstrictive on 5 day, neurological scores were increased, the SOD activity were decreased and MDA content were increased. In HTK group. SOD activity increased and MDA content decreased. **Conclusion** Human tissue kallikrein could dilate basilar artery, alleviate neurological changes and adjust the level of oxygen free radicals obviously in rabbits with symptomatic cerebral vasospasm.

Key words Cerebral vasospasm; Oxygen free radicals; Human tissue kallikrein; Rabbit

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后可导致颅内发生一系列并发症,其中症状性脑血管痉挛(symptomatic cerebral vasospasm, SCVS)是 SAH 患者致残和致死的主要原因^[1]。前期研究发现人组织激肽释放酶可以改善症状性脑血管痉挛,但其确切的机制尚未完全阐明^[2]。已有研究发现人组织激肽释放酶可以明显调节氧自由基代谢对脏器起到保护效应^[3]。本研究将建立兔迟发性脑血管痉挛模型,通过观察兔行为学、影像学、蛋白组学等改变,来探讨人组织激肽释放酶对症状性脑血管痉挛后脑氧自由基代谢的影响。

材料与方法

1. 动物选择及实验分组:选用健康日本大耳白兔 30 只,体重 2.0~2.5 kg,雌雄不拘,由温州医学院动物实验中心提供。按照改良 Endo 方法制备兔症状性脑血管痉挛模型^[4]。首先结扎双侧颈总动脉,喂养 2 周,将死亡 4 只及出现严重神经功能缺损症状的 2 只兔排除于本实验。剩余的 24 只兔随机分为 3 组:Sham 组、SAH 组、HTK 组。

2. 血管痉挛模型的建立:所有实验动物均给予标准颗粒饲料和自来水喂养,将昼夜室温控制在 18~23℃。肌肉注射氯胺酮 25 mg/kg,氯丙嗪 12.5 mg/kg 行基础麻醉,以第 1 次枕大池注血时间为第 1 天(D1),SAH 组与 HTK 组分别于注血后第 1 天(D1)和第 3 天(D3)在枕大池内注入 1.5 ml 和 1 ml 未抗凝的自体动脉血,注血时间为 1 min。注血后将兔俯卧头低位 30 min。Sham 组兔于其他组同一时间向枕大池内注入等

量生理盐水。

3. 治疗药物的给予:HTK 组在第 1 次枕大池穿刺注血后 30 min 后通过耳缘静脉注射 $10 \times 10^{-3} \text{PNAU/kg}$ 的 HTK,1 PNAU 指在 37℃、pH8.0 的条件下,对硝基苯胺作为底物,1 min 水解 1 μmol 对硝基苯胺所需要的酶量,并用生理盐水稀释至 5 ml。以后每 24 h 给药 1 次直至处死前 1 天,连用 5 天。A 组与 B 组以同样方式经静脉给予 0.9% NaCl 5 ml。

4. 神经功能的观察:每只兔子在枕大池注血前 1 天(D0)和注血后每天进行神经功能评分,直至处死。按 Endo 标准,神经功能通过观察兔在平面上的运动分为 4 级^[4]:Ⅰ级:无神经功能缺损(正常);Ⅱ级:轻度或者可疑神经功能缺损(嗜睡、活动减少);Ⅲ级:中度神经功能缺损无反常运动(肢体无力);Ⅳ级:重度神经功能缺损伴随反常运动(划圈运动,爬行困难)。

5. 三维 CT 血管造影:实验动物兔分别于首次枕大池注血前 1 天(D0)和注血后 5 天(D5)行 3D-CTA。由 2 位经验丰富的放射科医生行 3D-CTA 技术并分别测量 D0 和 D5 的基底动脉上、中和下段 3 处的直径,取 3 点平均值作为基底动脉的直径。以 D0 的基底动脉直径作为基础值,D5 直径为痉挛值,痉挛程度以(基础值-痉挛值)/基础值 $\times 100\%$ 表示, < 15% 为轻度痉挛;15%~30% 为中度痉挛; > 30% 为重度痉挛^[5]。

6. 海马组织 SOD、MDA 的测定:每组兔子取出新鲜海马组织,将海马组织放入装有 0.45 ml 预冷生理盐水玻璃匀浆管中,冰浴条件下,先用匀浆杆人工磨碎脑组织,再用组织捣碎机 10000 r/min 研磨,10 秒/次,共 4 次。经 3000 r/min 离心

5min。取脑组织匀浆采用采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量(试剂盒由南京建成生物工程研究所提供),采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 含量(试剂盒由南京建成生物工程研究所提供)。

7. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计分析软件,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间差异统计用单因素方差分析,两两比较使用 *LSD* 检验,组内比较采用配对 *t* 检验。各组神经功能评分因是等级资料采用 *Kruskal – wallis* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 动物神经功能缺损观察结果:SAH 组首次注血后兔表现为精神萎靡,自主活动减少,但对正常刺激有反应,摄食和饮水量明显减少。待 2 次注血后上述症状又有显著加重,D5 时最为严重,总共有 4 只兔子表现为 3 级和 4 级。Sham 组除 1 只兔子表现为 2 级外,余 7 只均无神经功能缺损。HTK 组在 2 次蛛网膜注血后 D5 时的神经功能状况比 SAH 组兔子状况明显改善($P < 0.05$),见表 1。

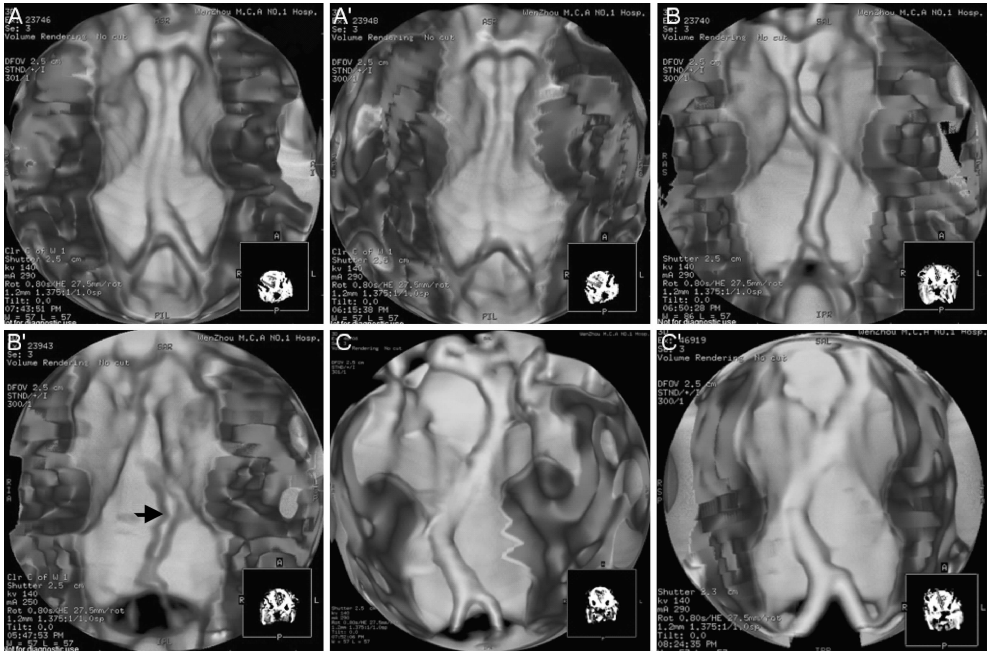


图 1 各组兔基底动脉 CTA 图

A 组图片为 Sham 组兔基底动脉造影,在两个时间点基底动脉未发生明显改变,A 为 D0 时的基底动脉,A'为 D5 时的基底动脉;B 组图片为 SAH 组兔基底动脉造影,在注血后,基底动脉出现了明显的痉挛,管壁凹凸不平(黑色箭头所示),B 为兔 D0 的基底动脉,B'为兔 D5 的基底动脉;C 组图片为 HTK 组兔基底动脉造影,在注血后未观察到明显的血管痉挛,C 为兔 D0 的基底动脉,C'为兔 D5 的基底动脉

表 2 各组基底动脉直径变化比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	D0 直径 (mm)	D5 直径 (mm)	动脉直径改变 平均百分比(%)	动脉痉挛 程度(%)
Sham 组	1.66 ± 0.14	1.64 ± 0.11 [#]	99.2 ± 3.7 [#]	-0.5 ± 2.2 [#]
SAH 组	1.71 ± 0.16	1.42 ± 0.20 [*]	83.2 ± 8.4	19.3 ± 14.1
HTK 组	1.67 ± 0.19	1.71 ± 0.14 [#]	104.0 ± 8.7 [#]	-3.9 ± 8.7 [#]

同一组内与 D0 比较,^{*} $P < 0.05$;同一时间点,与 SAH 组比较,[#] $P < 0.05$

表 1 各组 D5 时神经症状观察结果

组别	神经功能缺损分级(只)			
	1	2	3	4
Sham 组 [*]	7	1	0	0
SAH 组	0	4	3	1
HTK 组 [*]	2	5	1	0

与 SAH 组相比,^{*} $P < 0.05$

2. D – CTA 所测的基底动脉直径变化:3D – CTA 显示兔双侧颈总动脉结扎 2 周后未行注血前即 D0 的基底动脉发生明显的扩张与迂曲(图 1A)。Sham 组兔 D5 基底动脉无明显痉挛,眼观无明显差别(图 1A')。SAH 组兔 D5 的基底动脉血管明显发生痉挛,管壁凹凸不平(图 1B'),直径较术前发生明显狭窄($P < 0.05$)。HTK 组基底动脉未发生痉挛,与 SAH 组相比,D5 直径差异有显著性($P < 0.05$),见图 1C'、表 2。

3. 海马 SOD、MDA 值测定:与 Sham 组相比,SAH 组 SOD 值明显降低($P < 0.05$);与 SAH 组比较,HTK 组 SOD 值明显增加($P < 0.05$);与 Sham 组相比,SAH 组 MDA 值明显降低($P < 0.05$),与 SAH 组比较,HTK 组 MDA 值明显增加($P < 0.05$),见表 3。

表3 海马 SOD 和 MDA 值($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	SOD(NU/mg)	MDA($\mu\text{mol/mg}$)
Sham 组	222.9 $\pm$ 14.72 *	21.37 $\pm$ 1.27 *
SAH 组	199.6 $\pm$ 12.31	26.11 $\pm$ 1.70
HTK 组	227.7 $\pm$ 9.75 *	20.02 $\pm$ 1.93 *

与 SAH 组相比, * $P < 0.05$

讨 论

SAH 后发生 CVS 的确切机制尚未完全阐明, 一般认为, CVS 是多因素和多机制综合作用的结果。研究表明, 脑血管痉挛是蛛网膜下腔出血后最为常见的并发症之一, 细胞膜的脂质过氧化反应及自由基的产生是导致脑血管痉挛的发病机制之一, 其中大量活性氧自由基通过刺激血管壁导致血管炎性反应, 造成血管壁水肿, 平滑肌坏死, 内膜增生等反应, 最终发生持久脑血管痉挛, 而血管痉挛可导致脑缺血, 可引起迟发性缺血性神经功能障碍, 是患者致残与致死的主要原因^[6,7]。

SAH 后氧自由基过度产生的机制包括: 线粒体呼吸链的断裂、细胞外氧合血红蛋白的聚集、产生氧自由基的酶的上调以及内源性抗氧化系统的失调如 SOD 活性降低^[8]。SOD 是体内重要的氧自由基清除酶, 其活性高低可直接反映体内氧自由基的清除能力。MDA 是氧自由基与生物膜多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应形成脂质过氧化物的代谢产物, 可交联蛋白质和磷脂上的氨基, 生成 Schiff 碱, 降低膜流动性, 导致细胞变形, 功能受损。因此, 组织中 SOD 和 MDA 含量的高低可反映机体脂质过氧化程度, 间接反映了机体细胞受氧自由基攻击的严重程度。本研究通过建立兔症状性脑血管痉挛模型, 通过造模前后的行为学与影像学观察来明确造模成功, 同时通过海马区 SOD 与 MDA 水平的观察, 发现 SAH 后 SOD 水平明显降低, MDA 水平明显升高, 表明 SAH 后氧自由基水平发生明显改变, 并伴随着脑血管痉挛与神经功能障碍。

研究表明, 抗氧化剂如替拉扎特、褪黑素、依达拉奉等能够抑制脂质过氧化反应, 减少氧自由基生成从而减轻 SAH 后脑血管痉挛^[9]。人组织激肽释放酶(human tissue kallikrein, HTK)作为一种从人尿液中提取得到的蛋白水解酶, 具有扩张脑动脉, 促进缺血脑组织新生血管的生成和抑制细胞凋亡等作用, 已经在临床应用于脑梗死患者的治疗^[12]。目前已有研究发现 HTK 同样具有抑制氧化应激反应, 调节氧自由

基水平等作用, 其可能机制为通过 HTK 释放激肽与体内激肽 B2 受体结合, 促进 Akt 磷酸化, 降低 NAD(P)H 氧化酶活性, 抑制超氧化物来发挥神经保护作用^[3]。本研究在以往研究的基础上, 进一步深入探讨 HTK 在改善脑血管痉挛后神经功能障碍的机制, 从实验中, 发现 HTK 具有扩张痉挛的脑基底动脉的作用, 同时具有调节 SOD 与 MDA 水平, 从而改善脑血管痉挛后的神经功能, 达到脑保护的作用。HTK 具有明显扩张痉挛的基底动脉, 调节脑内氧自由基水平, 并可以减轻 SAH 后神经功能症状, 起到脑保护作用。但是 HTK 具体通过何种作用途径调节脑内氧自由基水平, 其机制需进一步研究。

参考文献

- Janjua N, Mayer SA. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2003, 9(2): 113 - 119
- 莫云长, 王一川, 董冬梅, 等. 不同剂量人组织激肽释放酶对兔症状性脑血管痉挛的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2010, 30(2): 216 - 219
- Chao J, Chao L. Experimental therapy with tissue kallikrein against cerebral ischemia[J]. 2006, 11: 1323 - 1327
- Endo S, Branson PJ, Alksne JF. Experimental model of symptomatic vasospasm in rabbits[J]. *Stroke*, 1988, 19: 1420 - 1425
- 周乐平, 王均灼, 胡章勇, 等. 三维 CT 血管造影在兔症状性脑血管痉挛模型中的应用[J]. *浙江医学*, 2008, 30(1): 44 - 46
- 王嘉伟, 高觉民. 蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的发生机制及治疗新进展[J]. *医学研究杂志*, 2010, 39(3): 7 - 10, 104
- Sehba FA, Pluta RM, Zhang JH. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2011, 43(1): 27 - 40
- Ayer RE, Zhang JH. Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2008, 104: 33 - 41
- Suzuki H, Kanamaru K, Kuroki M, *et al.* Effects of tirilazad mesylate on vasospasm and phospholipid hydroperoxides in a primate model of subarachnoid hemorrhage[J]. *Stroke*, 1999, 30(2): 450 - 456
- Nakagomi T, Yamakawa K, Sasaki T, *et al.* Effect of edaravone on cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2003, 12(1): 17 - 21
- Aladag MA, Turkoz Y, Parlakpinar H, *et al.* Melatonin ameliorates cerebral vasospasm after experimental subarachnoidal haemorrhage correcting imbalance of nitric oxide levels in rats[J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(11): 1935 - 1944
- 丁德云, 吕传真, 丁关萍, 等. 人尿激肽原酶治疗急性脑梗死多中心随机双盲安慰剂对照试验[J]. *中华神经外科杂志*, 2007, 40(5): 306 - 310

(收稿日期: 2012 - 05 - 26)

(修回日期: 2012 - 06 - 29)