

# 西维来司钠对脑出血模型大鼠脑组织损伤的保护作用研究

黄艳<sup>1\*</sup>, 王波<sup>1</sup>, 董志<sup>2#</sup>, 杨洪波<sup>1</sup>, 何科容<sup>1</sup>(1.重庆市南川区人民医院, 重庆 408400; 2.重庆医科大学, 重庆 400016)

中图分类号 R965;R743.34 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)41-3879-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.41.14

**摘要** 目的:研究西维来司钠对脑出血模型大鼠脑组织的保护作用及其机制。方法:取40只大鼠随机均分为假手术组、模型组和西维来司钠高、中、低剂量(200、80、30 mg/kg)组,除假手术组大鼠行假手术外其余各组大鼠行手术建立脑出血模型。假手术组和模型组大鼠建模前30 min尾静脉注射0.9%氯化钠注射液,西维来司钠各剂量组大鼠同法尾静脉注射相应药物。各组大鼠建模术后24 h检测血肿周围脑组织中中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)、一氧化氮(NO)及髓过氧化物酶(MPO)的含量和血肿脑组织中核转录因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠血肿周围脑组织中NE、NO、MPO含量均明显增加( $P<0.01$ ),血肿脑组织中NF- $\kappa$ B表达明显增强( $P<0.01$ )。与模型组比较,西维来司钠高、中剂量组大鼠血肿周围脑组织中NE、NO、MPO含量均明显减少( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),血肿脑组织中NF- $\kappa$ B表达明显减弱( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),西维来司钠低剂量组大鼠上述指标差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:西维来司钠对脑出血模型大鼠的脑组织有明显的保护作用,其机制可能与NE、NO、MPO含量减少及NF- $\kappa$ B表达减弱有关。

**关键词** 西维来司钠;大鼠;脑出血;保护作用

## Study on Protective Effects of Sivelestat Sodium on Cerebral Tissue Damage in Cerebral Hemorrhage Model Rats

HUANG Yan<sup>1</sup>, WANG Bo<sup>1</sup>, DONG Zhi<sup>2</sup>, YANG Hong-bo<sup>1</sup>, HE Ke-rong<sup>1</sup>(1.Chongqing Nanchuan District People's Hospital, Chongqing 408400, China; 2.Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study protective effects of sivelestat sodium on cerebral tissue damage in cerebral hemorrhage model rats and its mechanism. **METHODS:** 40 rats were randomly divided into sham operation group, model group and sivelestat sodium high-dose, medium-dose and low-dose (200, 80 and 30 mg/kg) groups. Cerebral hemorrhage model was induced by surgery in all groups except sham operation group. Sham operation and model group were given intravenous injection of 0.9% Sodium chloride solution via tail vein 30 min before modeling. All sivelestat sodium groups were given intravenous injection of relevant medicine via tail vein at the same time. The contents of NE, NO, MPO in cerebral tissue around the hematoma and the expression of NF- $\kappa$ B in cerebral tissue were observed 24 h after modeling. **RESULTS:** Compared with sham operation group, the contents of NE, NO and MPO in cerebral tissue around the hematoma and the expression of NF- $\kappa$ B in cerebral tissue were increased obviously in model group ( $P<0.01$ ). Compared with model group, the contents of NE, NO and MPO in cerebral tissue around the hematoma and the expression of NF- $\kappa$ B in cerebral tissue were decreased significantly in sivelestat sodium high-dose and medium-dose groups ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); there was no statistical significance in above index of sivelestat low-dose group ( $P>0.05$ ). **CONCLUSIONS:** Sivelestat sodium has a noticeable protective effect on cerebral tissue of cerebral hemorrhage model rats. The mechanism is probably related to the decrease in the contents of NE, NO and MPO and the expression of NF- $\kappa$ B.

**KEY WORDS** Sivelestat sodium; Rats; Cerebral hemorrhage; Protective effects

脑出血(Cerebral hemorrhage)是严重危害老年人的一种常见病、多发病,且发病率、死亡率和致残率均较高,是急性脑血管病中的危重类型<sup>[1]</sup>。脑出血时,除了血肿的占位性病变外,患者还会出现一系列继发性脑损伤,如脑水肿、缺血、炎症反应、血肿周围组织能量代谢紊乱及氧自由基损伤等<sup>[2-3]</sup>。由于脑出血病理生理机制复杂,其病因学尚未完全清楚,多数患者仍然以内科保守治疗为主,至今还没有特效的治疗方法<sup>[4]</sup>。西维来司钠(Sivelestat sodium)是一种小分子中性粒细胞弹性蛋白酶(Neutropil elastase, NE)抑制剂,能选择性抑制NE,可用于急性肺损伤的治疗。近年国外有研究报道西维来司钠能

够改善脑缺血/再灌注引起的脑水肿、脑损伤及炎症反应<sup>[5]</sup>,能减轻呼吸系统疾病的炎症反应<sup>[6]</sup>。但西维来司钠对脑出血引起的脑组织损伤是否也有保护作用,目前国内外少见相关报道。本研究选用目前最常用且建模成功率较高的胶原酶诱导建立脑出血模型,探讨西维来司钠对脑出血模型大鼠脑组织的保护作用及机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

大鼠脑主体定位仪(国营西北光学仪器厂);电子分析天平(德国 Sartorius 公司);低温离心机(美国 Sigma 公司);紫外分光光度计(上海光电医用仪器有限公司);BI2000 免疫组化分析系统(成都泰盟科技公司)。

### 1.2 药品与试剂

VII型胶原酶(美国 Sigma 公司,批号:C0130,含量:0.25~

\* 主管药师,硕士。研究方向:神经药理学。E-mail:379754164@qq.com

# 通信作者:教授,博士研究生导师。研究方向:神经药理学。电话:023-86485358。E-mail:zhidong073@hotmail.com

1.0 U/mg);水合氯醛(苏州正兴化工厂,批号:070120,分析纯);西维来司钠(重庆医药工业研究院,批号:070310,纯度:99.5%);一氧化氮(NO)试剂盒、髓过氧化物酶(MPO)试剂盒和免疫组化试剂盒(南京建成科技有限公司);核转录因子κB(NF-κB)抗体(北京中山生物技术有限公司);NE酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司)。

### 1.3 动物

健康Wistar大鼠40只,清洁级,♂,体质量200~250g,购自重庆医科大学实验动物中心,使用许可证号:SCXK(渝)2007-0001。

## 2 方法

### 2.1 分组与建模

40只大鼠适应性喂养3d后,随机分为假手术组、模型组和西维来司钠高、中、低剂量组,每组8只。除假手术组外,其余各组大鼠参考Rosenberg GA等<sup>[7]</sup>的方法建立脑出血模型,建模手术后各组大鼠分笼饲养。假手术组和模型组大鼠于建模前30min分别经尾静脉缓慢给予0.9%氯化钠注射液(生理盐水),西维来司钠高、中、低剂量组大鼠分别同法给予200、80、30mg/kg的西维来司钠溶液<sup>[8]</sup>。

### 2.2 标本的收集与处理

各组大鼠术后24h经水合氯醛麻醉后快速断头取脑,分离血肿周围脑组织和血肿脑组织,精确称质量,置于-70℃保存备用。测定时,将血肿周围脑组织用生理盐水在冰浴环境下以玻璃匀浆器制成10%的脑组织匀浆。

### 2.3 血肿周围脑组织中NE、NO及MPO含量的测定

取各组大鼠10%的血肿周围脑组织匀浆,4℃下12000×g离心5min,取上清液待测。采用双抗体夹心ELISA法,按相应试剂盒说明书操作测定血肿周围脑组织中NE、NO及MPO含量。

### 2.4 血肿脑组织中NF-κB表达的检测

采用免疫组化法,将各组大鼠的血肿脑组织切片放入4%的多聚甲醛中,固定24h后经乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,连续冠状切片;将组织切片粘贴于经多聚赖氨酸处理过的载玻片上,免疫组化染色,按照试剂盒说明书操作。显微镜下观察并照相,以组织中有明显二氨基联苯氨(DAB)棕褐色染色者判断为阳性。采用BI2000免疫组化分析系统进行阳性细胞计数,计算4个视野的阳性细胞平均数。

### 2.5 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计分析,所测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way-ANOVA)。P<0.05为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 血肿周围脑组织中NE、NO及MPO的含量变化

与假手术组比较,模型组大鼠血肿周围脑组织中NE、NO及MPO含量均明显增加(P<0.01);与模型组比较,西维来司钠高、中剂量组大鼠血肿周围脑组织中NE、NO及MPO含量均明显减少(P<0.05或P<0.01),西维来司钠低剂量组大鼠上述指标差异无统计学意义(P>0.05)。各组大鼠血肿周围脑组织中NE、NO、MPO的含量变化见表1。

### 3.2 血肿脑组织中NF-κB的表达变化

假手术组大鼠脑组织内几乎无NF-κB表达。与假手术组比较,模型组大鼠血肿脑组织中NF-κB表达明显增强(P<0.01);与模型组比较,西维来司钠高、中剂量组大鼠血肿脑组

表1 各组大鼠血肿周围脑组织中NE、NO、MPO的含量和血肿脑组织中NF-κB表达变化( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 The contents of NE, NO and MPO in cerebral tissue around the hematoma and the expression of NF-κB in cerebral tissue of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	NE, ng/ml	NO, μmol/g prot	MPO, U/g	NF-κB, 个/4个视野
假手术组	0.356±0.043	1.56±0.26	0.063±0.016	1.50±1.29
模型组	2.398±0.324*	3.13±0.17*	0.291±0.022*	25.00±6.48*
西维来司钠高剂量组	1.353±0.294*	2.04±0.21**	0.196±0.023**	8.25±3.40**
西维来司钠中剂量组	1.696±0.325*	2.43±0.31**	0.243±0.019**	14.25±6.80*
西维来司钠低剂量组	2.128±0.190	3.00±0.25	0.278±0.023	20.25±6.70

与假手术组比较: \*P<0.01;与模型组比较: #P<0.05, \*\*P<0.01

vs. sham operation group: \*P<0.01; vs. model group: #P<0.05,

\*\*P<0.01

织中NF-κB表达均明显减弱(P<0.01或P<0.05),西维来司钠低剂量组大鼠该指标差异无统计学意义(P>0.05)。各组大鼠血肿脑组织中NF-κB表达的显微镜图见图1,结果见表1。

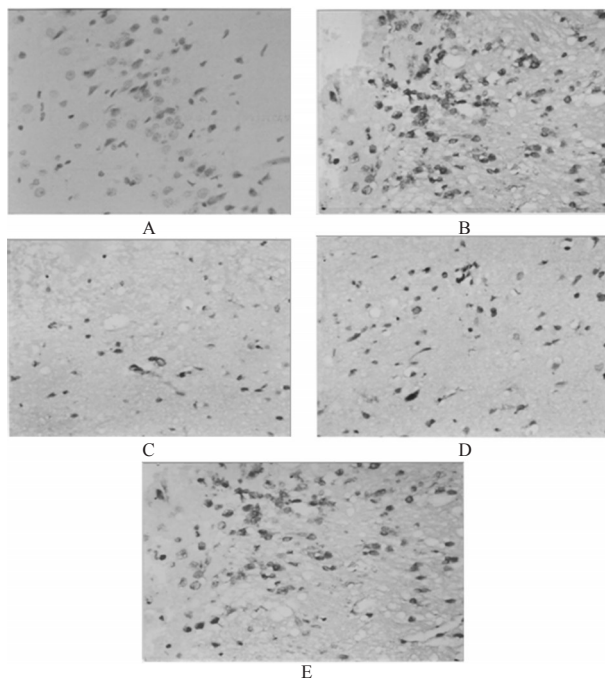


图1 各组大鼠血肿脑组织中NF-κB表达的显微镜图(×400)

A.假手术组;B.模型组;C.西维来司钠高剂量组;D.西维来司钠中剂量组;E.西维来司钠低剂量组

Fig 1 The expression of NF-κB in cerebral tissue of rats in each group by microscope(×400)

A. sham operation group; B. model group; C. sivelestat sodium high-dose group; D. sivelestat sodium medium-dose group; E. sivelestat sodium low-dose group

## 4 讨论

NE是一种内源性蛋白酶,生理情况下位于中性粒细胞嗜苯胺蓝颗粒中,主要参与对革兰阴性杆菌的杀灭作用;同时也参与中性粒细胞迁移,促进炎症因子如白细胞介素2(IL-2)、IL-6、IL-8等的表达,调节炎症反应,因此它对于机体防御功能非常重要。但在炎症情况下,激活的中性粒细胞释放大量的NE至细胞外,引起弹性蛋白、蛋白多糖和胶原等的降解,从而导致组织、细胞和血管基底膜损伤。国外研究报道NE与大鼠

脑缺血/再灌注引起的脑损伤有关,用西维来司钠治疗可以明显改善脑组织损伤,其作用机制可能与其减少NE的生成有关<sup>[9]</sup>。在正常情况下,NO作为一种血管舒张因子参与脑血管舒缩的调节,而高浓度的NO却是神经细胞损伤的毒性分子<sup>[9]</sup>。本研究显示模型组大鼠表现出典型的脑出血病理学改变,证明建模是成功的,模型组大鼠血肿周围脑组织中NE、NO含量较假手术组明显增加。NE抑制剂西维来司钠处理不仅能降低模型大鼠血肿周围脑组织中炎症细胞浸润,减轻神经细胞损伤,还能减少NE、NO含量,并与剂量呈正相关。这表明西维来司钠对脑出血模型大鼠的脑组织具有保护作用,其机制可能与抑制NE、NO的生成有关。

NF- $\kappa$ B是一种重要的细胞核转录调节因子,它广泛参与炎症反应、肿瘤细胞的增殖与凋亡及人类的多种疾病。本研究发现脑出血后血肿周围组织NF- $\kappa$ B表达增加、MPO含量明显增加,这两者之间存在紧密联系。结合前人的实验研究结果我们可以推测ICH大鼠脑内MPO含量的增加是由于NF- $\kappa$ B表达增强,引起细胞间黏附分子1(ICAM-1)表达增加<sup>[10]</sup>,从而导致大量炎症细胞浸润。本研究显示西维来司钠能呈剂量正相关地降低大鼠血肿脑组织中NF- $\kappa$ B表达、降低MPO含量,与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。

综上所述,西维来司钠对脑出血模型大鼠的脑组织有明显的保护作用,其机制可能与NE、NO、MPO含量减少及NF- $\kappa$ B表达减弱有关。

#### 参考文献

[1] Kase CS, Kurth T. Prevention of intracerebral hemorrhage recurrence[J]. *Continuum: Minneap Minn*, 2011, 17 (6 2ndary stroke prevention): 1 304.

[2] Kahles T, Vatter H. Glucocorticoids for the prevention of cerebral edema in traumatic brain injury: mission (im) possible? [J]. *Crit Care Med*, 2013, 41(5): 1 378.

[3] 张春燕,李亚明. 还原注射液对实验性脑出血大鼠脑组织显微、超微结构的影响[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(1): 186.

[4] Sansing LH, Kaznatcheeva EA, Perking CJ, et al. Edema after intracerebral hemorrhage: correlation with coagulation parameters and treatment[J]. *Neurosurg*, 2003, 98(5): 985.

[5] Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi S, et al. Neutrophil elastase inhibitor prevents ischemic brain damage via reduction of vasogenic edema[J]. *Hypertens Res*, 2010, 33(7): 703.

[6] Koga H, Miyahara N, Fuchimoto Y, et al. Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge: neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway responses[J]. *Respir Res*, 2013, 14: 8.

[7] Rosenberg GA, Mun-bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 1990, 21(5): 801.

[8] 凌海平, 杭春华, 李伟, 等. 西维来司钠对小鼠颅脑创伤后神经保护作用的研究[J]. *中国神经外科疾病研究杂志*, 2012, 11(3): 231.

[9] Tang XQ, Fang HR, Zhou CF, et al. A novel mechanism of formaldehyde neurotoxicity: inhibition of hydrogen sulfide generation by promoting overproduction of nitric oxide[J]. *Plos One*, 2013, 8(1): 1 371.

[10] 迟春玲, 苏志强, 马晶, 等. 西维来司钠对大鼠脑缺血再灌注后梗死体积、TNF- $\alpha$ 和ICAM-1表达的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2009, 26(1): 69.

(收稿日期:2013-07-22 修回日期:2013-08-28)

## 国家卫计委2013年主管报刊图书出版管理工作会议在武汉召开

**本刊讯** 2013年9月13日,中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会(以下称国家卫计委)2013年主管报刊图书出版管理工作会在武汉召开,崔丽副主任出席会议并讲话。

崔丽传达了全国宣传思想工作会议有关精神,要求全面加强卫生计生宣传思想工作,对委管报刊图书在卫生计生新闻宣传、科学普及和成果展示方面取得的成绩给予肯定,要求全面发挥委管报刊图书卫生计生宣传工作主阵地作用,增强工作的责任感和使命感,担负起舆论引导的责任,引领和推动学科和事业的发展。崔丽指出,委直属新闻出版单位、委管报刊图书主办单位、出版单位应进一步提升卫生计生报刊图书管理水平,坚持正确导向,巩固壮大主流思想舆论,敢于担当,提高做好舆论引导工作的能力。注重加强调查研究,加快转企改制步伐。同时,要加强卫生计生新闻出版队伍建设尤其是主办单位、出版单位领导班子的建设,造就高素质卫生计生新闻出版人才队伍,不断推动委管图书和全国卫生计生报刊

图书工作的发展。

国家卫计委宣传司负责人员作了主管报刊图书出版工作报告,对主管部门和主办单位、出版单位的管理工作进行了梳理和总结,通报了近年来委管报刊图书出版单位开展的工作和取得的成绩,并针对年检和日常管理中发现的问题,提出进一步抓管理、抓规范、抓精品、抓信息化和改革的工作部署。

国家新闻出版广电总局新闻报刊司司长王国庆参加了会议并就报刊管理和出版体制改革政策作了专题报告。对目前国家非时政类报刊改革特别是报刊编辑部改革的最新政策进行了解读,要求广大卫生计生报刊统一认识,学好政策,分门分类进行积极改革创新。

国家卫计委各报刊图书主办单位、出版单位共计150余人参会并进行交流。会议还组织参会代表参加了首届刊博会相关主题活动。