

蛛网膜下腔出血患者脑脊液中内皮素、氧合血红蛋白表达与脑血管痉挛相关性*

吴德模, 管义祥, 居兴云, 缪永华, 陆 正, 李 军, 王海波, 丁锦荣

(南通大学附属海安医院 神经外科, 江苏 南通 226600)

[摘 要] 目的: 探讨蛛网膜下腔出血患者脑脊液中内皮素、氧合血红蛋白的表达与脑血管痉挛的关系。方法: 采集 74 例蛛网膜下腔出血患者脑脊液标本, 采集时间为入院后第 1、3、7、10、14 天, 用放射免疫方法测定脑脊液中内皮素浓度, 比色法测定脑脊液中氧合血红蛋白的浓度, TCD 检测颅内主要动脉血流速度, 分析内皮素及氧合血红蛋白浓度与脑血管痉挛的相关性。结果: 出血后第 3 天脑脊液中内皮素及氧合血红蛋白浓度增高, 在出血后第 7 天达到高峰, 此后逐渐下降; 发病后 1~3 d 大脑中动脉流速增快, 第 7 天达峰值, 第 14 天后明显减慢; 大脑中动脉血流速度与脑脊液内皮素浓度、氧合血红蛋白浓度呈正相关($r=0.751$ 及 $r=0.458$)。结论: 蛛网膜下腔出血患者脑脊液中内皮素与氧合血红蛋白含量与出血后脑血管痉挛程度呈正相关。

[关键词] 内皮素; 脑血管痉挛; 氧合血红蛋白; 蛛网膜下腔出血

[中图分类号] R743.35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)06-0629-03

Analysis on the Relationship of Endothelin and Oxyhemoglobin to Cerebral Vasospasm in Patients with Subarachnoid Hemorrhage

WU Demo, GUAN Yixiang, JU Xingyun, MIAO Yonghua, LU Zheng, LI Jun, WANG Haibo, DING Jingrong
(Department of Neurosurgery, the Affiliated Hai'an Hospital of Nantong University, Nantong 226600, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and concentration of endothelin and oxyhemoglobin in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with subarachnoid hemorrhage, and to explore their regulatory effects on cerebral vasospasm. **Methods:** CSF of 74 patients with subarachnoid hemorrhage was collected on the 1st, 3rd, 7th, 10th and 14th day after subarachnoid hemorrhage. Radioimmunoassay method was applied to determine endothelin concentration in the CSF. The concentration of oxyhemoglobin in CSF was determined with colorimetry. TCD was used to measure the blood flow velocity of middle cerebral artery. The relationship of endothelin and oxyhemoglobin with cerebral vasospasm was analyzed. **Results:** The levels of oxyhemoglobin and endothelin in CSF remarkably increased on the 3rd day, and reached peak on the 7th day, and then decreased gradually. Middle cerebral artery blood flow velocity became faster on the 1st-3rd day, reached peak on the 7th day, slowed down after the 14th day. Middle cerebral artery blood flow velocity was positively correlated with endothelin and oxyhemoglobin concentration. **Conclusions:** The levels of endothelin and oxyhemoglobin in CSF of patients with subarachnoid hemorrhage positively correlate with cerebral vasospasm degree.

[Key words] endothelin; cerebral vasospasm; oxyhemoglobin; subarachnoid hemorrhage

脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)是蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后大脑底部大容量动脉管腔的迟发性挛缩,作为 SAH

最严重的并发症,可引起弥漫性脑水肿和迟发性缺血性神经损伤,是 SAH 致死和致残的首要原因。CVS 发病机制复杂,与多种因素有关^[1]。最近研

*[基金项目]南通市社会发展科技计划资助项目 S10922。

究表明,氧合血红蛋白(oxyhemoglobin,OxyHb)和血管内皮素(endothelin,ET)被公认为肯定的致血管痉挛物质,可通过 Rho/Rho 激酶和蛋白激酶 C (protein kinase C,PKC)信号系统发挥血管收缩作用,在人和动物中 Rho 激酶活性升高,在 CVS 的发病机制中发挥重要作用^[2-3]。本研究对 74 例 SAH 患者脑脊液中 ET 及 OxyHb 浓度进行检测,探讨 ET、OxyHb 浓度对 SAH 后 CVS 的影响及其机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2009 年 5 月~2012 年 4 月急诊室及神经内外科住院 SAH 患者 74 例,其中男 39 例、女 35 例,年龄 30~74(40.6±9.96)岁,全部患者于发病后 3 d 内经临床确认,头颅 CT 检查无改变患者经腰穿检查而确诊,剔除并发有高血压、脑血管病、糖尿病、尿毒症等疾病的患者。

1.2 脑血管痉挛的测定

采用 TCD(以色列 RIMED DIGI-LITE)探头置于双侧颞窗或枕窗,分别探测双侧大脑中动脉(middle cerebral artery,MCA),计算机储存检测数据,脱机分析记录平均血流速度。

1.3 方法

患者均在住院后立即给予钙离子拮抗剂、提高血压、血容量及血液稀释治疗(3H 治疗)。所有病例均在发病后第 1、3、7、10 及 14 天腰穿留取脑脊液,低温保存,集齐标本后集中检测。

1.3.1 ET 测定 用放射免疫方法测定脑脊液中 ET 浓度。被测样品或 ET 标准品与一定量的 125I-

ET 及一定量的 ET 抗血清溶液加在一起,混合后在 4℃温育 24 h,而后加入免疫分离剂,ET 与抗体的复合物产生沉淀。离心分离,测定总放射性(T),吸取上清液再测定沉淀放射性(B),计算各标准点的结合率(B/B₀%),作出标准曲线,被检样品可根据 B/B₀% 结合率,从标准曲线上查得 ET 浓度。

1.3.2 OxyHb 测定 应用比色法测定脑脊液中 OxyHb 的浓度。取脑脊液标本 2 ml,3 000 r/min 离心 5 min,弃取上清液,测定沉淀物。用分光光度计测定 A₅₄₀、A₅₆₀、A₅₇₆ 时的吸光度值,然后用下列公式计算 OxyHb 浓度: $OxyHb = (1.474 7A_{576} - 0.682A_{560} - 0.532 9A_{540}) \times 10^{-4}$ 。

1.4 统计学处理

采用 PASW Statistics (Version18.0 汉化)统计软件分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较用 *t* 检验,多组间比较用完全随机设计方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MCA 血流速度

在发病后 1~3 d MCA 流速增快,第 7 天达峰值,第 14 天后明显减慢,见表 1。

2.2 OxyHb 浓度

SAH 患者发病后 OxyHb 的浓度在第 3 天开始上升,第 7 天达到高峰,第 7 天与第 1、3 天相比有统计学意义(*t* = 2.10, *P* < 0.05);发病后第 14 天与第 7 天 OxyHb 比较明显降低,差异有统计学意义(*t* = 2.14, *P* < 0.05)。见表 1。

表 1 SAH 患者脑脊液 ET 和 OxyHb 水平及大脑中动脉血流速度变化($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Changes of ET concentration, OxyHb concentration and middle cerebral artery blood flow velocity in SAH patients

发病后	OxyHb(mmol/L)	ET(ng/L)	MCA 血流速度(cm/s)
第 1 天	0.990 93 ± 0.3381 27	90.237 8 ± 28.835 01	97.789 2 ± 12.787 19
第 3 天	1.323 65 ± 0.334 516	177.020 3 ± 34.544 87	139.525 7 ± 25.792 39
第 7 天	1.567 11 ± 0.395 979	226.094 6 ± 36.032 10	195.795 9 ± 24.221 28
第 10 天	1.485 49 ± 0.326 280	221.018 9 ± 29.422 59	152.858 1 ± 20.703 01
第 14 天	1.097 31 ± 0.407 036	90.867 6 ± 26.913 04	84.405 4 ± 22.638 87

2.3 脑脊液 ET 和 OxyHb 水平与 MCA 血流速度相关性 在发病后第 3 天 ET 和 QxyHb 开始增高,第 7 天达到高峰,此后逐渐降低,第 14 天明显降低。MCA 血流速度与脑脊液 ET 浓度、OxyHb 浓度呈正相关(ET: *r* = 0.751, *P* < 0.05; OxyHb: *r* =

0.458, *P* < 0.05)。

3 讨论

脑血管痉挛是 SAH 后一个潜在危险因素,它

是动脉瘤患者 SAH 后致死、致残的主要原因。症状性脑血管痉挛可产生延迟性缺血性神经功能障碍(delayed ischemic neurological deficit, DIND), 是 SAH 后的重要并发症之一, 其发生率约为 17% ~ 50%。CVS 潜在的危险性大, 但其发病确切机制至今尚未完全清楚, 近年来学者们对 SAH 所致脑血管痉挛的发生机制进行了大量的研究, 提示 CVS 的发生与多种因素相关, 包括血液溶解产物(氧合血红蛋白等)、内皮系统、一氧化氮(nitric oxide, NO)系统、Rho/Rho 激酶、PKC 通路、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)等众多因素, 但有些观点大相径庭^[4]。

OxyHb 是迄今比较肯定的致血管痉挛物质, SAH 后红细胞溶解释放的 OxyHb 是引起 CVS 的始动因素。Zacharia 等^[5]研究发现, SAH 出血量与血管痉挛严重程度有明显正相关, 其导致 CVS 发生的机制可能有: (1) 直接作用于脑血管而导致脑血管痉挛; (2) OxyHb 脂质过氧化反应而产生氧自由基, 诱导血管内皮细胞产生 ET, 抑制血管内皮细胞释放内皮源性舒张因子(endothelial-derived relaxing factor, EDRF), 特别是对内源性 NO 具有清除作用, 进而影响 ET-1 和 NO 的平衡而阻碍血管舒张, 进一步导致氧自由基和脂质过氧化物不断累积, 引起和加重 CVS, 进入恶性循环; (3) OxyHb 还可激活 Rho/Rho 激酶通路和 PKC, 在 CVS 过程中发挥重要作用^[6]。

ET 是至今发现收缩血管最强烈的物质之一, 正常情况下, 血管内皮细胞产生的 NO、CGRP 与 ET 处于动态平衡状态, 维持着正常的血管舒缩功能。SAH 时, OxyHb 一方面造成 NO、CGRP 减少, 同时高浓度的 OxyHb 直接刺激血管内皮细胞产生 ET, ET 增多并在 OxyHb 存在时达到可致血管收缩的浓度, 并且激活 Rho/Rho 激酶通路和 PKC, 破坏血管舒缩平衡, 引起血管痉挛。ET 受体拮抗剂不仅阻断了 ET 的致痉挛作用, 还明显减少了 PKC 的产生, 揭示了 ET 的作用是通过 ET 受体启动, 激活 Rho 激酶、PKC 而实现的^[8-9]。近年来, ET 受体 A (endothelin-receptor A, ETRA) 抑制剂已进入大规模临床实验, 应用 ETRA 受体抑制剂的 SAH 病人, 无论脑血管痉挛的发生率还是严重程度均明显低于对照组^[10]。OxyHb 与 ET 在 SAH 后脑血管痉挛的发生中具有协同作用, 有研究证实, 单一低浓度不引起血管收缩的 ET 在 OxyHb 存在时可以导

致血管持续强烈收缩, 肝素可多靶点治疗 SAH 后 DIND^[11]。本研究提示 ET、OxyHb 与 CVS 发生都呈正相关, 其中 ET 与 CVS 发生相关性要明显高于 OxyHb, OxyHb 与 ET 是 SAH 后 CVS 的肯定致痉挛物质, 但这两种致痉挛物质之间的关系是协同作用还是允许作用值得探讨。

4 参考文献

- [1] Zhang H, Wang X, Li X, et al. Reversible cerebral vasoconstriction syndrome and subarachnoid hemorrhage, which occurs first[J]. Intern Med, 2012(1): 135-137.
- [2] Walsh M P. Vascular smooth muscle myosin light chain diphosphorylation: mechanism, function, and pathological implications[J]. IUBMB Life, 2011(11): 987-1000.
- [3] Kikkawa Y, Matsuoka S, Kameda K, et al. Mechanisms underlying potentiation of endothelin-1-induced myofilament Ca^{2+} sensitization after subarachnoid hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012(2): 341-352.
- [4] Muroi C, Seule M, Mishima K, et al. Novel treatments for vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. Curr Opin Crit Care, 2012(2): 119-126.
- [5] Zacharia B E, Ortega-Gutierrez S, Connolly E S, et al. The clinical implications of subarachnoid hemorrhage volume[J]. World Neurosurg, 2012(5-6): 613-614.
- [6] Luo C, Yi B, Chen Z, et al. PKG1 α inhibits the proliferation of cerebral arterial smooth muscle cell induced by oxyhemoglobin after subarachnoid hemorrhage[J]. Acta Neurochir Suppl, 2011(Pt 1): 167-171.
- [8] Munakata A, Ohkuma H, Shimamura N, et al. Effect of a free radical scavenger, edaravone, on free radical reactions: related signal transduction and cerebral vasospasm in the rabbit subarachnoid hemorrhage model[J]. Acta Neurochir Suppl, 2011(Pt 2): 17-22.
- [9] Stricklett P K, Strait K A, Kohan D E, et al. Novel regulation of endothelin-1 promoter activity by protein kinase C[J]. Cell Biochem Biophys, 2011(3): 643-650.
- [10] Kramer A, Flecher J. Do endothelin-receptor antagonists prevent delayed neurological deficits and poor outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage?: a meta-analysis[J]. Stroke, 2009(10): 3403-3406.
- [11] Simard J M, Schreibman D, Alelnich E F, et al. Unfractionated heparin: multitargeted therapy for delayed neurological deficits induced by subarachnoid hemorrhage[J]. Neurocrit Care, 2010(3): 439-449.

(2012-08-27 收稿, 2012-10-08 修回)

编辑:文箫颖