

· 论 著 ·

不对称二甲基精氨酸在蛛网膜下腔出血后的表达研究

黄巍, 周政[△], 刘俊, 杨辉, 陈军花, 辛志成

(第三军医大学新桥医院神经外科, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨蛛网膜下腔出血(SAH)后血浆与脑脊液不对称二甲基精氨酸(ADMA)含量与脑血管痉挛(CVS)的关系。方法 采用枕大池二次注血法建立 SAH 后 CVS 兔模型, 分别于术前、术后 1、4、7d 行经颅多普勒超声检查测定基底动脉血流速度, 应用酶联免疫分析法测定不同时间血浆和脑脊液中 ADMA 含量。结果 (1)SAH 后脑脊液中 ADMA 浓度显著高于注血前正常水平($P < 0.05$), 第 4 天达到峰值后逐渐下降; 而血浆中 ADMA 水平在 SAH 前后变化不明显。(2)SAH 后血管痉挛程度逐渐加重, 基底动脉血流速度第 4 天达到最大值, 其后逐渐减慢($P < 0.05$), 与 ADMA 水平时相表达一致。(3)SAH 后脑脊液中 ADMA 浓度变化趋势与基底动脉血流速度变化呈正相关。结论 SAH 后 CVS 程度与脑脊液中 ADMA 表达含量密切相关, 与血浆中水平无明显相关性, SAH 后脑脊液中 ADMA 含量能反映迟发性脑血管痉挛发生发展的过程。

关键词:蛛网膜下腔出血; 脑血管痉挛; 不对称二甲基精氨酸; 经颅多普勒

中图分类号: R742.35

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)24-3127-03

Study on expression level of asymmetric dimethylarginine after subarachnoid hemorrhage model in rabbit

HUANG Wei, ZHOU Zheng[△], LIU Jun, et al.

(Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the dynamical changes of asymmetric dimethylarginine(ADMA) in serum and cerebral spinal fluid(CSF) following subarachnoid hemorrhage(SAH), and to access the relationship between the concentrations of ADMA and cerebral vasospasm(CVS). **Methods** An experimental cerebral vasospasm rabbit model was achieved by twice injections of fresh autologous arterial blood into the cisterna magna of each animal, the velocity of basilar artery(BA) was measured by transcranial Doppler(TCD) before injection and on 1, 4, 7d after twice injections. At the same time, the serum and CSF concentrations of ADMA was measured by ELISA method. **Results** (1)The concentrations of ADMA in CSF increased significantly than that before injection ($P < 0.05$) and decreased gradually after reaching the highest level on 4d, while the concentrations in serum presented no significant change; (2)The degrees of CVS became serious after SAH and relieved gradually after reaching the peak flow velocity of basilar artery on 4d ($P < 0.05$); (3)The change of the ADMA in the CSF were correlated positively with the velocity of basilar artery. **Conclusion** The degree of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage is positively related to the concentration of ADMA in cerebral spinal fluid, while shows no significant correlation with the concentration in serum. The elevation of the concentrations of ADMA in CSF after SAH can reflect the development of delayed cerebral vasospasm.

Key words: subarachnoid hemorrhage; cerebral vasospasm; asymmetric dimethylarginine; transcranial doppler

近半个世纪来, 各国学者对 SAH 后 CVS 的发生机制进行了广泛而深入的研究, 其中基础研究已证实出血后蛛网膜下腔内的内源性血管舒张物质 NO 的减少是 CVS 形成的重要原因。近年来, 在心肾疾病研究领域内源性 NOS 抑制物不对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine ADMA)在调节 NO 水平方面的作用越来越引起重视^[1]。但迄今为止对其在脑血管疾病中的作用研究鲜有报道。本研究旨在观察内源性 NOS 抑制物 ADMA 在二次注血 SAH 动物模型中血浆与脑脊液中的表达变化规律, 探究 ADMA 表达水平与脑血管痉挛的相关性, 为寻找有效的脑血管痉挛防治方法及药物靶标提供理论基础。

1 材料与方

1.1 主要仪器与试剂 3%戊巴比妥钠; 抑肽酶; EDTA; ADMA ELISA 试剂盒; 经颅多普勒超声仪; 离心机。

1.2 实验动物 4 个月龄成年新西兰白兔 48 只, 由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供并饲养, 雌雄不拘, 体重 2.0~2.5kg, 平均 2.2kg。动物饲养与实验均遵照第三军医大学实验动物饲养与使用规定。SAH 组 32 只, 假手术组及对照组各 8 只。

1.3 动物 SAH 模型的建立 耳缘静脉注射 3%戊巴比妥钠(1mL/kg), 穿刺针穿刺枕大池。取股动脉非抗凝血 1mL/kg, 缓慢注入兔枕大池内。首次注血 48h 后, 依法再次枕大池注血 0.8mL/kg, 此日作为 SAH 后 0d。假手术组枕大池注入生理盐水两次, 对照组无特殊处理。

1.4 标本采集 分别在术前以及建模后 1、4 和 7d 经枕大池穿刺留取脑脊液标本 1.5 mL。4℃条件下 4 000 r/min 离心 10 min, 分离上清液后 -70℃保存。测定前样品置于室温或冷水中复融, 再次在 4℃, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液待测。同时在相应时相点取 2mL 静脉血。

1.5 检测方法 建模成功后, 于术前、术后 1、4 和 7d 行基底动脉经颅多普勒超声(TCD)测定基底动脉脑血流速度, 应用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定不同时间脑脊液中和血浆中 ADMA 含量。分别于相应时间点随机抽取实验兔做多聚甲醛固定液灌注固定, 取基底动脉行病理观察。如有动物实验中死亡则相应补齐。

1.6 统计学方法 本文数据采用 SPSS 13.0 统计软件包进行处理, 假手术组与实验组以重复测量实验方差分析(analysis of repeated measures)的方法进行分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。相关

[△] 通讯作者。

性分析采用单因素直线相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型的行为学观察 建模成功后,SAH 组出现毛发蓬松及自洁性差,摄食减少,呈头低位蜷缩状,活动明显减少,无明显偏瘫或截瘫。而假手术组、对照组精神、食欲基本正常。

2.2 SAH 后各时相点血浆及脑脊液中 ADMA 水平变化 见表 1、2。SAH 组与假手术组组间脑脊液 ADMA 水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。在术后 1d 开始升高,4d 继续升高至峰值后逐渐下降($P < 0.05$)。SAH 组与假手术组组间血浆 ADMA 水平比较差异不明显。

2.3 各时间段内颅内基底动脉血流速度的变化 见表 3。SAH 组术后 1、4、7d 基底动脉峰值血流速度较术前有明显增高。于 4d 达到最高值($P < 0.05$),呈现高尖的高阻高流频谱。假手术组及对照组基底动脉峰值血流速度变化不明显。

表 1 兔脑脊液中 ADMA 水平变化($\mu\text{mol/L}$)

组别	n	术后 1d	术后 4d	术后 7d
正常对照组	8	0.50±0.05	0.49±0.06	0.50±0.08
假手术组	8	0.49±0.08	0.51±0.05	0.50±0.05
SAH 组	14	0.76±0.21*	1.42±0.15*	0.92±0.15*

与假手术组比较,* : $P < 0.05$ 。

表 2 兔血浆中 ADMA 水平变化($\mu\text{mol/L}$)

组别	n	术后 1d	术后 4d	术后 7d
正常对照组	8	0.94±0.20	0.88±0.22	0.91±0.16
假手术组	8	0.95±0.21	0.87±0.24	0.90±0.19
SAH 组	14	0.86±0.10	0.93±0.27	0.92±0.21

表 3 兔基底动脉血流速度变化(cm/s)

组别	n	术后 1d	术后 4d	术后 7d
正常对照组	8	21.39±3.02	20.55±4.07	20.06±3.38
假手术组	8	20.32±2.66	20.04±3.66	21.07±3.84
SAH 组	14	28.13±4.11*	44.21±0.95*	32.90±5.21*

与假手术组比较,* : $P < 0.05$ 。

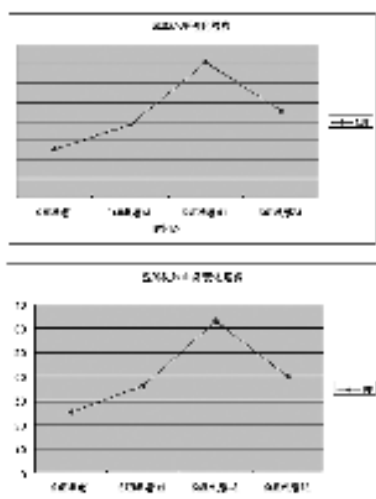


图 1 SAH 后兔脑脊液中 ADMA 水平及基底动脉血流速度变化趋势

2.4 病理学观察结果 见插图 IV 图 13。假手术组的血管结构与正常对照组一样,血管壁光滑无增厚,内皮细胞结构完整,内弹力膜清晰可见,结构完整;中膜平滑肌细胞及其周围的细胞外基质排列整齐;外膜主要由成纤维细胞和疏松的结缔组织构成。SAH 模型组可见血管壁增厚,管腔狭窄,内皮细胞变性、肿胀,染色质不均,空泡形成;内弹力膜迂曲皱褶或断裂,厚薄不均;中膜增厚,平滑肌细胞排列紊乱。以术后第 4 天最为明显。

2.5 脑脊液中 ADMA 与基底动脉血流速度的相关性分析 见图 1。SAH 后 4d 脑脊液中 ADMA 浓度变化与脑血流速度的变化呈显著正相关($r = 0.863, P < 0.01$)。ADMA 在脑脊液中浓度越高,血管痉挛越明显。

3 讨论

近年的基础研究表明,一些介质、体液因子以及出血后的蛛网膜下腔内的微环境在 CVS 发生机制中起着重要作用。多数学者逐渐达成共识,认为 CVS 是多因素、多环节共同作用的结果,触发、维持脑血管痉挛发生、发展进程的因子并未全部为人们所认识,其致病机制、相互作用有待于进一步的深入研究。在影响 CVS 形成和发展的多因素中,一氧化碳(NO)的重要作用和必要性已经得到广泛公认。以往研究表明,SAH 后症状性 CVS 的发生与脑脊液中 NO 浓度降低有密切相关性,NO 浓度越低,血管痉挛发生率越高^[2]。NO 合成减少的原因目前研究未有定论,Hino 等^[3]通过实验性猴 SAH 模型发现,在血管痉挛期间内皮依赖的舒张机制抑制与血管内皮细胞受损后内皮型 NO 合酶(eNOS)产生的 NO 减少关系密切。作为对痉挛血管具有重要神经保护的 eNOS^[4],其在 SAH 后脑组织以及血管组织中表达的研究至今仍存在争议^[5],有研究显示在狗 SAH 后 7d 以及大鼠 SAH 后 3d 的痉挛基底动脉中 eNOS 的表达变化不明显^[6-7]。还有研究发现在迟发脑血管痉挛的灵长目模型中,eNOS mRNA 的免疫活性无变化甚至增强。最近 Jung 等^[8]研究表明,内源性 eNOS 抑制物 ADMA 在 SAH 的脑脊液中水平呈动态变化,可能为蛛网膜下腔内 NO 水平下降的重要影响因素。作者研究结果同样证实,脑脊液 ADMA 水平在 SAH 模型兔的表达呈规律性,出血后呈上升趋势,到第 4 天达到最高峰后逐渐回落。与相关文献报道的兔脑血管痉挛的发生及发展在时相上较一致。ADMA 是由含甲基化精氨酸残基的蛋白质分解代谢而来的小分子物质,相对分子质量为 202kd,能取代 eNOS 上的精氨酸,从而达到竞争性抑制 eNOS 的作用。除了阻断 NO 的合成,它们还能使 eNOS 解耦联并导致过氧化物的生成^[9]。高浓度的 ADMA 能与精氨酸竞争 Y+运载体系统^[10]。蛋白质精氨酸甲基转移酶(protein arginine methyl transferase,PRMT)催化所有蛋白质底物的精氨酸进行甲基化,二甲精氨酸二甲基氨基水解酶(dimethylarginine dimethylaminohydrolase,DDAH)则可特异地水解 ADMA 和 ADMA 的同源衍生物单甲基精氨酸(N-monomethyl-L-arginine,L-NMMA),生成瓜氨酸和二甲基胺/单甲基胺,这是 ADMA 和 L-NMMA 的主要生成代谢途径。目前研究证实,体内、体外试验采用外源性 ADMA 能使脑血管产生收缩^[11-12],其中大鼠模型中 10 μmol 的外源性 ADMA 可产生血管收缩^[13]。体外试验中,ADMA 能明显抑制动物和人类颅内血管对乙酰胆碱的舒张反应,但却无法抑制对硝普钠引发的舒张反应,这表了其依赖 eNOS 的内皮舒张功能与内皮独立性舒张功能的不同^[11,12]。近来研究已经证实,在体内试验中 SAH 后痉挛的脑血管对颈内动脉注射乙酰胆碱不仅丧失舒张反应能力,反而产生收缩作用。这与 Furchgott 等^[13]在 1980 年首先

描述的内皮剥离血管片段对乙酰胆碱的反应相一致,提示 SAH 后痉挛血管内膜的 eNOS 功能障碍,而此前已有研究证实,在 SAH 后灵长目痉挛血管对颈内动脉注射 NO 或者 NO 供体仍能维持舒张能力^[14]。以上研究均支持 SAH 后存在 eNOS 为主的内皮功能障碍的设想,也提示 ADMA 对 eNOS 活性抑制可能是促成 SAH 后迟发 CVS 的原因之一。本实验发现,SAH 后 4d 蛛网膜下腔里 ADMA 水平较假手术组和对照组明显增加且达到峰值,而此时基底动脉流速亦处于最高峰,ADMA 在水平及时相表达上与基底动脉血流速度的高度相关性强烈表明 ADMA 可能参与迟发性 CVS 全过程,ADMA 发挥最大抑制 NO 生成作用与血管痉挛时相一致,提示 ADMA 对 eNOS 活性的抑制极有可能促进 SAH 后迟发血管痉挛的形成,可能为重要的致痉挛因素。有望成为脑血管痉挛监测的有效指标。作为致内皮功能失调的危险因子,ADMA 已成为内皮功能障碍的一个重要预测指标。但目前的研究方向主要集中在心血管疾病、糖尿病等领域。在中枢神经系统方面则鲜有报道。鉴于组织中 ADMA 水平在局部血管病理生理中较血浆内水平更为关键,本研究着眼于 SAH 后脑脊液循环系统的微环境,关注其对于脑血流的影响。进一步明确脑血管痉挛的发生机制,旨在为临床脑血管痉挛监测提供一个简单、便利、安全的指标。

参考文献:

[1] Pluta RM. Dysfunction of nitric oxide synthases as a cause and therapeutic target in delayed cerebral vasospasm after SAH[J]. *Neurol Res*, 2006, 28: 730.
 [2] 陈果,马颖,程远.蛛网膜下腔出血后脑脊液检测对脑血管痉挛的预测性研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(10): 969.
 [3] Hino A, Tokuyama Y, Weir B, et al. Changes in endothelial nitric oxide synthase mRNA during vasospasm after subarachnoid hemorrhage in monkeys[J]. *Neurosurgery*, 1996, 39(3): 562.
 [4] 鲁向辉,迟路湘,刘恺鸣.大鼠脑微血管内皮细胞体外缺血再灌注模型的建立及他汀的保护作用[J]. *重庆医学*, 2008, 37(3): 293.
 [5] Park KW, Metais C, Dai HB, et al. Microvascular endothelial dysfunction and its mechanism in a rat model of subarachnoid hemorrhage [J]. *Anesth Analg*, 2001, 92:

990.
 [6] Kasuya H, Weir BK, Nakane M, et al. Nitric oxide synthase and guanylate cyclase levels in canine basilar artery after subarachnoid hemorrhage[J]. *Neurosurg*, 1995, 82: 250.
 [7] McGirt MJ, Lynch JR, Parra A. Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage[J]. *Stroke*, 2002, 33: 2950.
 [8] Jung CS, Iuliano BA, Harvey-White J, et al. Association between cerebrospinal fluid levels of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, and cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage[J]. *Neurosurg*, 2004, 101: 836.
 [9] Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 59(4): 824.
 [10] Maxwell AJ. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases[J]. *Nitric Oxide*, 2002, 6(2): 101.
 [11] Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM, et al. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease [J]. *Circulation*, 2000, 101(16): 1899.
 [12] Segarra G, Medina P, Ballester RM, et al. Effects of guanidine compounds on human cerebral arteries[J]. *Stroke*, 1999, 30: 2206.
 [13] Furchgott R, Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine[J]. *Nature*, 1980, 288: 373.
 [14] Pluta RM, Oldfield EH, Boock RJ, et al. Reversal and prevention of cerebral vasospasm by intracarotid infusions of nitric oxide donors in a primate model of subarachnoid hemorrhage[J]. *Neurosurg*, 1997, 87: 746.

(收稿日期:2009-05-27 修回日期:2009-06-20)

(上接第 3126 页)

行预处理(氟达拉滨 30mg/m²、米托蒽醌 10mg、阿糖胞苷 1.5 g/m²)并加上了抗胸腺球蛋白免疫抑制剂:ATG 5mg/kg 共 2d。

目前,此例自体纯化 CD34⁺ 细胞移植治疗特发性嗜酸性粒细胞增多症在国内尚未见报道,该例患者随访 3 个月余,病情稳定,证明自体纯化 CD34⁺ 细胞移植是治疗 HES 的有效手段,尚须进一步积累病例和临床经验,对于提高治疗效果是有益的探索。

参考文献:

[1] Wardlaw AJ, Kay AB. 威廉姆斯血液病学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2001:785.
 [2] 达万明. 外周血干细胞移植[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:163.

[3] 刘欣,邢莉民. 特发性嗜酸细胞增多症与慢性嗜酸细胞白血病研究进展[J]. *国外医学输血及血液学分册*, 2005, 28(2): 231.
 [4] 王萍,李尊昌. 慢性嗜酸细胞白血病和高嗜酸细胞综合征[J]. *现代实用医学*, 2004, 10: 599.
 [5] Richel DJ, Johnsen HE, Canon J, et al. Highly purified CD34⁺ cell isolated using magnetically activated cell selection provide rapid engraftment following high dose chemotherapy in breast cancer patients[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 25: 243.
 [6] Roufosse F, Schandene L, Sibille C, et al. T-cell receptor-independent activation of clonal Th2 cells associated with chronic hypereosinophilia[J]. *Blood*, 1999, 94: 994.

(收稿日期:2009-04-13 修回日期:2009-06-13)