

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.26.018

中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂对颅脑创伤大鼠 血脑屏障通透性和脑水肿的影响*

苏海, 苏祖禄[△], 贺学农, 周昌龙, 陈皓, 夏小辉, 张毅

(重庆医科大学附属永川医院神经外科 402160)

摘要:目的 探讨中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)抑制剂对颅脑创伤(TBI)大鼠血脑屏障(BBB)通透性改变和脑水肿的影响。方法 将 99 只大鼠分为对照组、TBI 组和干预组(分为 6、24、48、72、168 h 亚组),复制大鼠液压打击模型,干预组给予西维来司钠,分别测定各组脑组织 NE 的浓度、BBB 通透性和脑组织含水率,并进行比较分析。结果 TBI 组和干预组大鼠脑组织 NE 浓度、BBB 通透性和脑组织含水率在各时间点都高于对照组,干预组的 NE 浓度在 24、48、72、168 h 低于 TBI 组, BBB 通透性和脑组织含水率在 48、72、168 h 低于 TBI 组($P < 0.05$)。结论 西维来司钠能抑制 TBI 大鼠脑组织 NE 的释放,降低 BBB 的通透性并减轻脑水肿发生,表明西维来司钠对大鼠 TBI 继发性损伤有保护作用。

关键词:颅脑损伤;蛋白酶抑制蛋白质类,分泌;西维来司钠;脑水肿

中图分类号:R651

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)26-3458-03

Research on effect of neutrophil elastase inhibitor on blood-brain barrier permeability and cerebral edema in TBI rats*

Su Hai, Su Zulu[△], He Xuenong, Zhou Changlong, Chen Hao, Xia Xiaohui, Zhang Yi

(Department of Neurosurgery, Affiliated Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of neutrophil elastase(NE) inhibitor on the blood-brain barrier(BBB) permeability and hydrocephalus in rats with traumatic brain injury(TBI). **Methods** 99 SD rats were randomly divided into the control group, the TBI group and the intervention group(dividing into 5 sub-groups;6,24,48,72,168 h). The hydraulic impact model of rats was duplicated. Sivelestat sodium was given in the intervention group. The NE concentration in the brain tissue, BBB permeability and brain water content were detected in each group and performed the comparative analysis. **Results** The NE concentration in the brain tissue, BBB permeability and brain water content at each timepoint in the TBI group and the intervention groups were higher than those in the control group. The NE concentration at 24,48,72,168 h in the intervention group was lower than that in the TBI group. The BBB permeability and the brain water content at 48,72,168 h in the intervention group were lower than those in the TBI group($P < 0.05$). **Conclusion** Sivelestat sodium can inhibit the NE release in TBI rat brain tissue, reduce the BBB permeability and the occurrence of hydrocephalus, which indicating that sivelestat sodium has the protective effect on TBI secondary lesion in rat.

Key words: craniocerebral trauma; proteinase inhibitory proteins, secretory; sivelestat sodium; brain edema

中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)是广泛存在于中性粒细胞、肥大细胞和巨噬细胞内的一种基质金属蛋白酶,在机体的损伤、炎症等生理、病理过程中发挥着重要作用^[1]。作为一种丝氨酸蛋白水解酶,NE可以降解胶原蛋白、弹性蛋白、纤维连接蛋白等,增加毛细血管通透性^[2]。研究者还发现,NE可以通过降解细胞外基质和破坏内皮细胞增加血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性^[3]。西维来司钠是NE的特异性抑制剂,能够抑制NE的生物活性,减少炎症介质的产生和聚集,改善能量代谢障碍等,对肝脏、肺、心等组织、器官的损伤有显著的保护作用^[4],但是对颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)的继发性损害有无保护作用少见报道。本研究采用液压打击制作TBI大鼠模型,西维来司钠作为干预因素,检测大鼠脑组织的NE浓度、BBB通透性以及脑组织含水率的动态变化,探讨西维来司钠对脑组织NE浓度的变化和颅脑损伤后BBB通透性改变和继发性脑水肿的影响。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性健康SD大鼠99只,体质量200~250g,由

重庆医科大学动物实验中心提供。

1.1.2 仪器与试剂 西维来司钠由重庆医药工业研究院提供。大鼠NE定量检测试剂盒ELISA购自深圳晶美生物工程有限公司。微量输液泵购自江苏沙洲实验仪器厂;台式离心机购自上海鸽牌;721分光光度计购自上海光电。

1.2 方法

1.2.1 分组 将99只SD大鼠分为对照组(9只)、TBI组和干预组(各45只),其中TBI组和干预组又按6、24、48、72、168h时间点分为5个亚组,每亚组9只大鼠,大鼠适应性喂养3d,造模后SD大鼠按亚组分笼饲养,正常喂食、喂水。干预组于造模后经股静脉用微量输液泵按 $10\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,以1 mL/h的流速持续输注,给药时间不超过24h;TBI组造模后和对照组都经股静脉用微量输液泵按 $1\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速持续输注,给药时间同干预组。

1.2.2 TBI模型制作 按Thompson等^[5]方式制作模型,用100g/L水合氯醛(3 mL/kg)经腹腔麻醉大鼠,立体定位仪固定大鼠头部,沿头皮正中作切口,剥离骨膜,取前凶人字缝尖连线中点偏左0.4cm颅骨钻孔,暴露硬脑膜。打击管内注水后

* 基金项目:重庆市卫生局面上项目(2012-2-157);永川区科委自然科学基金(Ycstc2013nc8029)。作者简介:苏海(1978—),硕士研究生,副主任医师,主要从事神经系统肿瘤和颅脑损伤的研究。△ 通讯作者, Tel:13650529008; E-mail:panda957@tom.com。

表 1 大鼠脑组织 NE 浓度的比较($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

组别	n	6 h	24 h	48 h	72 h	168 h
对照组	9	0.33±0.03	0.33±0.03	0.33±0.03	0.33±0.03	0.33±0.03
TBI 组	45	0.89±0.10 ^a	2.16±0.24 ^a	2.46±0.37 ^a	2.19±0.34 ^a	1.96±0.32 ^a
干预组	45	0.78±0.21 ^a	1.74±0.31 ^{ab}	1.89±0.52 ^{ab}	1.65±0.44 ^{ab}	1.61±0.47 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与 TBI 组比较。

表 2 大鼠脑皮质 EB 浓度的比较($\bar{x}\pm s$,ng/mg)

组别	n	6 h	24 h	48 h	72 h	168 h
对照组	9	4.17±0.39	4.17±0.39	4.17±0.39	4.17±0.39	4.17±0.39
TBI 组	45	8.96±0.37 ^a	9.89±0.87 ^a	13.20±0.86 ^a	12.23±0.60 ^a	8.99±0.63 ^a
干预组	45	8.73±0.41 ^a	9.45±0.53 ^a	10.39±0.97 ^{ab}	10.16±0.58 ^{ab}	9.02±0.71 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与 TBI 组比较。

表 3 大鼠脑含水率的比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	6 h	24 h	48 h	72 h	168 h
对照组	9	75.89±0.58	75.89±0.58	75.89±0.58	75.89±0.58	75.89±0.58
TBI 组	45	77.10±0.72 ^a	79.59±0.79 ^a	81.45±1.07 ^a	81.97±0.98 ^a	79.65±0.69 ^a
干预组	45	77.23±0.81 ^a	78.98±0.95 ^a	79.22±0.98 ^{ab}	79.67±1.10 ^{ab}	78.10±0.82 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与 TBI 组比较。

连接液压脑创伤打击装置,造成 TBI。

1.2.3 脑组织 NE 的测定 3 组大鼠分别于相应时间点,用水合氯醛麻醉,快速断头取脑,取脑组织精确称重,置于-70℃保存备用。测定时将脑组织用生理盐水在冰浴环境内以玻璃匀浆器制成 10% 的脑组织匀浆。采用 ELISA 测定 NE。

1.2.4 BBB 通透性的检测 3 组大鼠于预定的时间点经股静脉按 5 mL/kg 标准注射 2% 伊文氏兰(Evan's blue, EB),60 min 后,处死大鼠,取大鼠脑组织通过分光光度计检测渗出的 EB。

1.2.5 脑组织含水率测定 3 组大鼠在预定时间点,经水合氯醛麻醉后,迅速断头取脑,将取出的脑组织放在用生理盐水浸润过的滤纸上,以防止水分蒸发。去除软脑膜,精密称重。将脑组织置于 95℃ 恒温烘箱 24 h,再称取干重。按 Blliot 公式计算脑组织含水率=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3 统计学处理 采用的 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠脑组织内 NE 浓度的比较 TBI 组和干预组在 6、24、48、72、168 h 大鼠脑组织内 NE 浓度高于对照组($P<0.05$);干预组在 24、48、72、168 h 低于 TBI 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.2 各组大鼠脑组织 EB 浓度的比较 TBI 组和干预组大鼠脑皮质 EB 浓度在 6、24、48、72、168 h 高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);干预组在 6、24 h 脑组织 EB 低于 TBI 组,但差异无统计学意义($P>0.05$),在 48、72、168 h 低于 TBI 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.3 各组大鼠脑组织含水率的比较 TBI 组和干预组大鼠脑含水率在 24、48、72、168 h 高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);干预组在 6、24 h 脑组织含水率浓度低于 TBI 组,但差异无统计学意义($P>0.05$),在 48、72、168 h 低于 TBI 组,

差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

3 讨论

BBB 通透性改变和脑水肿是 TBI 继发性脑损伤的主要病理变化,成为影响伤情发展和预后的重要因素。分子生物学研究发现 NE 作为一种最重要的炎症介质,广泛参与 BBB 通透性改变和脑水肿发生发展的生理病理过程中。研究发现,NE 可以损伤细胞外基质,增强黏附因子表达,加重内皮细胞损伤,增加 IL-8、TNF- α 、氧自由基的产生,活化激肽、缓激肽、花生四烯酸等导致内皮细胞的损伤^[6]。NE 的特异性抑制剂西维来司钠已经成功研制并运用于临床,对各种实验性急性肺损伤具有良好的保护作用,目前主要用于治疗全身性炎症反应综合征、慢性阻塞性肺气肿等疾病^[7]。近年来,日本学者研究还发现西维来司钠能够减轻肝脏部分切除后的肝脏损伤,能够减少高迁移率族蛋白 1(HMGB1)的释放和降低 IL-6 的水平,与对照组比较,能够更加有效的促进患者恢复^[8]。有学者通过体外试验研究还发现西维来司钠可以通过减少 C3、C4 的激活对肾脏起到保护作用^[9]。

本实验结果说明西维来司钠可以减少脑组织中 NE 聚集和释放,从而降低其在脑组织中的浓度。但研究同时发现 6 h 干预组和 TBI 组的 NE 浓度差异无统计学意义,说明西维来司钠的抑制作用具有时间依赖性,需要连续给药、达到一定药物浓度和时间后才能发挥作用。本研究发现,无论是 TBI 组还是干预组,BBB 通透性的高低与 NE 浓度的高低都成同步性改变,说明脑组织中 NE 浓度的增加是 BBB 通透性增高的原因之一,间接证明了炎症介质是破坏 BBB,增加其通透性的重要原因。还有研究人员通过动物实验发现,静脉注射外源性 NE 能够破坏和分解肺泡表面活性物质的主要成分,导致肺血管和肺泡上皮通透性增高^[10]。西维来司钠能够有效地抑制 NE 所引起的炎症反应,可以降低 NE 对周围蛋白质降解和破坏^[11]。本实验发现,在干预组,通过连续静脉给予西维来司钠,大鼠 48、72、168 h 的 EB 浓度明显低于 TBI 组,说明了西维来司钠

能够有效地保护 BBB 结构,降低其通透性。通过对脑组织含水率的研究发现,TBI 大鼠脑组织含水率在造模后整个变化过程呈抛物线样改变,这种脑组织含水率的变化规律与脑组织内 NE 浓度的变化规律一致,而通过西维来司钠的干预后,脑组织含水率虽然仍明显高于对照组,但在 48、72、168 h 低于 TBI 组,说明了西维来司钠可以通过抑制 NE 的生物活性和降低 NE 浓度来减轻脑组织水肿,对脑组织起到一定的保护作用,这种在 TBI 过程中的保护作用与在脑组织缺血/再灌注损伤中研究结果基本一致,这种保护作用可能与抗炎、抗氧化、抗凋亡有关^[12]。

本研究结果提示:TBI 大鼠脑组织内 NE 浓度明显高于对照组。这表明创伤后,中性粒细胞释放的 NE 参与了脑组织损伤的病理过程,NE 在 TBI 的病理生化机制中可能起着重要作用,NE 可能是 BBB 通透性和脑组织含水率的增高重要因素之一,是 TBI 继发性脑水肿形成的重要原因。西维来司钠可抑制 NE 浓度的增高,降低 NE 的生物活性,可显著性降低 TBI 大鼠的 BBB 通透性和脑组织含水率,表明西维来司钠能够减轻 TBI 导致的继发性脑水肿。这一发现可能将为治疗 TBI 后脑水肿开辟一条新的途径。但目前对于西维来司钠减轻脑水肿的具体机制仍不明确,值得研究者继续探索。

参考文献:

- [1] Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, et al. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases[J]. *Pharmacol Rev*, 2010, 62(4): 726-759.
- [2] Tsujii S, Okabayashi T, Shiga M, et al. The effect of the neutrophil elastase inhibitor sivelestat on early injury after liver resection[J]. *World J Surg*, 2012, 36(5): 1122-1127.
- [3] Stowe AM, Adair-Kirk TL, Gonzales ER, et al. Neutrophil elastase and neurovascular injury following focal stroke and reperfusion[J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 35(1): 82-90.
- [4] Groutas WC, Dou D, Alliston KR. Neutrophil elastase in-

- hibitors[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2011, 21(3): 339-354.
- [5] Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N, et al. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation[J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22(1): 42-75.
- [6] Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions[J]. *Biochimie*, 2008, 90(2): 227-242.
- [7] Gunawardena KA, Gullstrand H, Perrett J. An oral neutrophil elastase inhibitor, in healthy volunteers and patients with COPD[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2013, 51(4): 288-304.
- [8] Roghanian A, Sallenave JM. Neutrophil elastase(NE) and NE inhibitors: canonical and noncanonical functions in lung chronic inflammatory diseases (cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease)[J]. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2008, 21(1): 125-144.
- [9] 张红, 苟大明, 李健权, 等. 西维来司钠对体外循环中血浆弹性蛋白酶、补体 C3、C4 及尿 NAG 的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(4): 331-333.
- [10] Lungarella G, Cavarra E, Lucattelli M, et al. The dual role of neutrophil elastase in lung destruction and repair[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(6/7): 1287-1296.
- [11] Iwata K, Doi A, Ohji G, et al. Effect of neutrophil elastase inhibitor (sivelestat Sodium) in the treatment of acute lung injury(ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): a systematic review and meta-analysis[J]. *Intern Med*, 2010, 49(22): 2423-2432.
- [12] 丁丽君, 董志, 乐乐, 等. 西维来司钠对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及机制[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(1): 54-58.

(收稿日期:2014-03-10 修回日期:2014-06-09)

(上接第 3457 页)

- [5] 王兆福, 张伯伟, 马茹, 等. 河南省骨髓库汉族捐献者 HLA-A、B、DR 高分辨基因多态性调查分析[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(31): 5801-5804.
- [6] 丁浩强, 叶欣, 梁华钦, 等. 广州地区献血人群 HLA-A、B、DRB1 高分辨等位基因及单体型多态性的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(9): 810-813.
- [7] 毛伟, 黄霞, 王蓉感, 等. 重庆地区人群 HLA-A、B、DRB1 基因多态性研究[J]. *重庆医学*, 2006, 35(14): 1286-1288.
- [8] 程良红, 金士正, 高素青, 等. 中国南北汉族人群 HLA-A*02 等位基因的分布差异[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(3): 321-324.
- [9] Wen SH, Lai MJ, Yang KL. Human leukocyte antigen-A, -B, and -DRB1 haplotypes of cord blood units in the Tzu Chi Taiwan Cord Blood Bank[J]. *Hum Immunol*, 2008, 69(7): 430-436.

- [10] Trachtenberg E, Vinson M, Hayes E, et al. HLA class I (A, B, C) and class II (DRB1, DQA1, DQB1, DPB1) alleles and haplotypes in the Han from southern China[J]. *Tissue Antigens*, 2007, 70(6): 455-463.
- [11] Yang G, Deng YJ, Hu SN, et al. HLA-A, -B, and -DRB1 polymorphism defined by sequence-based typing of the Han population in Northern China[J]. *Tissue Antigens*, 2006, 67(2): 146-152.
- [12] Shi L, Ogata S, Yu JK, et al. Distribution of HLA alleles and haplotypes in Jinuo and Wa populations in Southwest China[J]. *Hum Immunol*, 2008, 69(1): 58-65.
- [13] Ogata S, Shi L, Matsushita M, et al. Polymorphisms of human leucocyte antigen genes in Maonan People in China[J]. *Tissue Antigens*, 2007, 69(2): 154-160.

(收稿日期:2014-04-08 修回日期:2014-06-18)