论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1032-04

脑出血大鼠脑组织MDA、TNF-α含量变化及其依达拉奉干预效应的研究

崔 洁[1],曹参祥[1],郑 静[2],王景周[1] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042;[2]河北省保定市第二医院南院神经内科,保定 071051)

提 要:目的 观察3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮(MCI-186,商品名为依达拉奉)对出血性脑组织的保护作用和可能机制。**方法** 将96只Sprague-Dawley大鼠按随机数字表法分为假手术组、脑出血模型组、依达拉奉治疗组,每组32只。采用自体血脑内注入法制作大鼠脑出血模型,假手术组只进针不注血。依达拉奉治疗组大鼠腹腔注射依达拉奉(3 mg/kg),分别于造模前30 min及造模后1次/12 h。于6、24、72、168 h分别用Longa标准测定神经功能缺损;干、湿重法检测脑含水量;酶联免疫吸附法(ELISA)和硫代巴比妥酸法测定血肿周围组织中脑组织TNF-α和丙二醛(malondialdehyde,MDA)的含量。**结果** 与假手术组相比,脑出血模型组大鼠神经功能缺损评分、脑含水量、TNF-α和MDA含量均显著增高($P<0.05$);与脑出血模型组相比,依达拉奉治疗组大鼠神经功能缺损评分、脑含水量、TNF-α和MDA含量显著下降($P<0.05$)。**结论** 依达拉奉对出血后脑组织具有保护作用,其机制可能与抑制MDA和TNF-α的活性有关。

关键词: 依达拉奉;脑出血;脑含水量;丙二醛;肿瘤坏死因子-α

中图法分类号: R329.25; R743.34; R971 **文献标识码:** A

Changes of TNF-alpha and malondialdehyde content in brain tissue and therapeutic effect of edaravone on rats after intracerebral hemorrhage

CUI Jie[1], CAO Can-xiang[1], ZHENG Jing[2], WANG Jing-zhou[1] ([1]Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, [2]Department of Neurology, South Branch of Baoding Second Hospital, Baoding 071051, China)

Abstract: Objective To observe the protective effect of edaraven on brain tissue and the therapeutic mechanism in rats following intracerebral hemorrhage(ICH). **Methods** In this series, 96 Sprague-Dawley rats were divided into three groups at random($n=32$ in each group): sham-operative group, ICH model group and edaraven therapy group. ICH model was induced by infusion of autologous whole blood into the caudate-putamen. Rats in sham-operative group were treated the same as above, but no blood injected. Rats in edaraven therapy group were treated with edaraven (3 mg/kg) by peritoneal injection 30 min before operation and once per 12 hours after operation. These rats were killed at 6, 24, 72, and 168 h after neurologic impairment test with Longa criteria. Brain water content was measured by dry-wet weight method. Malondialdehyde and TNF-alpha in the vicinity of the hematoma were measured by thio-barbituric acid method and ELISA respectively. **Results** Compared with sham operative group, neurologic impairment score, brain water content, malondialdehyde and TNF-alpha in brain tissues were obviously higher in ICH model group ($P<0.05$). Compared with ICH model group, neurologic impairment score, brain water content, malondialdehyde and TNF-alpha in brain tissues were significantly decreased in edaraven therapy group ($P<0.05$). **Conclusion** Edaraven has an evident protective effect on injured brain tissue through inhibiting malondialdehyde and TNF-alpha content in the vicinity of the hematoma.

Key words: edaraven; intracerebral hemorrhage; brain water content; malondialdehyde; tumor necrosis factor-alpha

基金项目: 重庆市卫生局"十五"重点项目(00-1007)

Supported by the Foundation for the Key Scientific Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of Chongqing Bureau of Public Health(00-1007)

作者简介: 崔 洁(1968-),女,河北省保定市人,硕士研究生,主治医师,主要从事脑血管病方面的研究。电话:(023)68757363, E-mail: cuijie962004@sina.com

通讯作者: 王景周,电话:(023)68757363, E-mail: wangjzjm@163.com

收稿日期: 2006-12-04; **修回日期:** 2007-01-09

脑出血（intracerebral hemorrhage，ICH）发病率、病死率、致残率均较高，严重威胁人类健康和生命[1]。脑出血后脑水肿和继发性神经元损伤是影响脑出血患者病情程度及预后的重要因素。原发性脑出血时，血肿周围组织自由基、炎性因子活性变化可能与脑水肿的发生、发展有关。自由基清除剂 3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮（MCI-186，商品名为依达拉奉）在缺血性脑血管病治疗中广泛应用，但依达拉奉对出血性脑组织是否具有保护作用尚不清楚。本研究采用依达拉奉对脑出血大鼠进行干预，观察脑出血后大鼠脑含水量、神经功能损伤与自由基 MDA、炎性因子 TNF-α 之间的关系，以及依达拉奉治疗脑出血的效果，探讨其治疗作用的可能机制。

1　材料与方法

1.1　试剂与器材

主要试剂：大鼠 TNF-α ELISA 试剂盒（晶美生物工程有限公司）；考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）；蛋白标准（南京建成生物工程研究所）；丙二醛（MDA）测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

仪器：电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）；DHG-9123A 型电热恒温干燥箱（上海一恒科技有限公司）；立体定向仪（江湾Ⅰ型 C）（第二军医大学修配厂）；微量注射器（宁波市三爱仪器厂）；4°离心机（上海安亭科学仪器厂）；光学显微镜（日本 Olympus 公司）；722s 分光光度计（上海精科公司）；数显电热恒温水浴箱（上海一恒科技有限公司）。

1.2　实验动物及分组

成年 Sprague-Dawley 大鼠 96 只，雌雄各半，体质量（250 ± 20）g，由第三军医大学野战外科研究实验动物中心提供。实验动物用随机数字表法分为 3 组：假手术组、脑出血模型组和依达拉奉治疗组，每组 32 只。每组下设 4 个时相点，分别为 6、24、72、168 h。每个时相点 8 只，其中 4 只用来测脑水肿，4 只用来取脑组织匀浆做 TNF-α 和 MDA 的检测。脑出血模型组按照自体血注入法制作脑出血模型，假手术组在相同的部位只留针不注血，依达拉奉治疗组采用腹腔注射依达拉奉（3 mg/kg），分别于造模前 30 min 及造模后 1 次/12 h，直至相应的时相点。假手术组及脑出血模型组用等量的生理盐水腹腔注射。

1.3　脑出血动物模型制备

参照改良的自体尾动脉血两次注血法制作脑出血模型[1]。术后用医用骨蜡封闭骨孔，缝合头部皮肤，整个过程采用无菌操作。假手术组操作与制作模型步骤相同，但不注血。

1.4　神经功能缺损评分

参照 Longa[2]（1989）标准。各组大鼠在处死前进行神经功能缺损评分：0 级：无体征，记 0 分；Ⅰ级：动物不能完全伸直其前肢，记 1 分；Ⅱ级：动物一侧肢体瘫痪，有追尾现象，记 2 分；Ⅲ级：动物不能站立、打滚，记 3 分；Ⅳ级：无自发性活动，有意识障碍，记 4 分。评分在 1 ~ 4 之间且取脑时可见脑内血肿形成的大鼠入选实验组，表明脑出血模型制作成功。

1.5　脑含水量的测定

用干、湿重法测定。在各个时相点断头处死大鼠，立即取脑。去处小脑和脑干、间脑后，分成左右半脑。称取右侧半脑湿重后，放至 110 ℃电热干燥箱中烘干 24 h 至恒重，称取干重，按以下公式计算脑含水量。

脑含水量 =（湿重 − 干重）/湿重 × 100%

1.6　脑匀浆 TNF-α 浓度的检测

各组大鼠分别在不同时相点深度麻醉后断头取脑，用 4 ℃的冰盐水冲洗干净脑表面的血液，后用滤纸吸干净，以进针点作冠状切面，取血肿周围新鲜脑组织 200 mg，按照 1/9 的比例加入 PBS 缓冲液，冰浴下匀浆，4 ℃ 条件下 3 000 r/min，离心 15 min 后取上清液，即为待检样品。用 ELISA 法测定 TNF-α 的浓度。按照试剂盒说明操作，492 nm 处测吸光度值[$D(492)$]。手工绘制校正曲线。以标准品浓度作横坐标，$D(492)$ 作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的 $D(492)$ 可在校正曲线上查出 TNF-α 浓度。

1.7　脑匀浆 MDA 的检测

样本采集后经匀浆离心，取上清液，采用硫代巴比妥酸法，严格按照试剂盒说明书操作。

1.8　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　各组大鼠神经功能缺损的变化

脑出血模型组大鼠神经功能缺损在 24 h 最明显，各个时相点显著高于假手术组。依达拉奉治疗组大鼠各个时相点神经功能缺损均显著低于脑出血模型组（$P < 0.01$），但仍高于假手术组（表 1）。

表 1　各组大鼠神经功能缺损评分

组别	6 h	24 h	72 h	168 h
假手术组	0	0	0	0
脑出血模型组	1.667 ± 0.516	2.667 ± 0.516	2.000 ± 0.000	1.167 ± 0.408
依达拉奉治疗组	1.000 ± 0.000[a]	1.333 ± 0.516[a]	1.167 ± 0.408[a]	0

a：$P < 0.01$，与脑出血模型组比较

2.2　大鼠脑含水量的变化

脑出血模型组大鼠脑含水量从 6 h 开始逐渐增多，72 h 达高峰，与假手术组大鼠相比有显著差异（$P < 0.05$），168 h 差异不显著（$P > 0.05$）。依达拉奉治疗组大鼠从 6 ~ 72 h 脑含水量与脑出血模型组相比显著下降（$P < 0.05$），168 h 差异不显著（$P > 0.05$）；与假手术组比较无显著性差异（$P > 0.05$）（表 2）。

表 2　各组大鼠脑含水量的变化（$\bar{x} \pm s$，%）

组别	6 h	24 h	72 h	168 h
假手术组	77.22 ± 0.43	77.32 ± 0.08	77.51 ± 0.65	77.55 ± 0.13
脑出血模型组	78.96 ± 0.15[a]	79.33 ± 0.19[a]	79.97 ± 0.54[a]	78.01 ± 0.53
依达拉奉治疗组	77.39 ± 0.36[b]	78.04 ± 0.34[ab]	78.35 ± 0.23[b]	77.72 ± 0.43

a：$P < 0.05$，与假手术组比较；b：$P < 0.05$，与脑出血模型组比较

2.3 大鼠脑匀浆 TNF-α 的检测结果

脑出血模型组大鼠脑匀浆 TNF-α 含量从 6 h 开始逐渐增高,72 h 达高峰后回落,各个时相点与假手术组相比有显著性差异($P<0.05$)。依达拉奉治疗组大鼠脑匀浆 TNF-α 的含量明显降低,各个时相点与相应的脑出血模型组相比有显著性差异($P<0.05$);与假手术组相比无显著性差异($P>0.05$)(表3)。

表3 各组大鼠脑匀浆 TNF-α 含量(ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	24 h	72 h	168 h
假手术组	1.327±0.084	1.355±0.263	1.391±0.227	1.280±0.059
脑出血模型组	1.887±0.193[a]	2.052±0.244[a]	2.151±0.048[a]	1.783±0.214[a]
依达拉奉治疗组	1.415±0.054[b]	1.491±0.077[b]	1.566±0.137[b]	1.432±0.048[b]

a: $P<0.05$, 与假手术组比较;b: $P<0.05$, 与脑出血模型组比较

2.4 大鼠脑匀浆 MDA 的检测结果

脑出血模型组大鼠从 6~168 h 脑匀浆 MDA 含量呈逐渐增高趋势,各时相点均显著高于假手术组($P<0.05$)。依达拉奉治疗组大鼠各个时相点脑匀浆 MDA 含量与脑出血模型组相比均显著下降($P<0.05$),72、168 h 仍高于假手术组($P<0.05$)(表4)。

表4 各组大鼠脑匀浆 MDA 含量(nmol/mg, $\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	24 h	72 h	168 h
假手术组	97.04±6.66	102.38±9.07	114.04±6.11	128.04±4.04
脑出血模型组	217.71±36.06[a]	254.38±45.09[a]	264.38±20.82[a]	271.05±11.55[a]
依达拉奉治疗组	118.04±9.50[b]	141.05±35.12[b]	177.71±10.00[ab]	197.71±34.64[ab]

a: $P<0.05$, 与假手术组比较; b: $P<0.05$, 与脑出血模型组比较

3 讨论

研究表明,脑出血后血肿周围存在着一个组织损伤和水肿进行性加重的区域,该区域内脑组织发生着复杂的病理变化,严重地影响了脑出血患者病情程度及预后。在诸多的病理因素中,自由基的作用尤为重要。丙二醛(MDA)是自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物,代表氧自由基的含量。本实验结果显示:随着脑出血后脑组织中 MDA 含量的增高,脑水肿和脑神经功能缺损也明显加重。说明了脑出血后自由基的产生与脑水肿的发生、发展有关。这可能是由于原发性 ICH 时血肿周围组织受压,导致低灌注,在血肿周围形成了类似于缺血性脑血管病"半暗带"的区域。在血肿周围的低灌注区域内,由于缺血造成了黄嘌呤氧化酶的形成增加,在黄嘌呤氧化酶催化黄嘌呤转化为黄嘌呤并进而转变为尿酸的过程中可释放大量的电子,并为氧所接受,产生了超氧阴离子(O_2^-)和过氧化氢(H_2O_2),H_2O_2在红细胞分解产生的金属离子铁的参与下形成了更为活跃的羟自由基(OH·);另外,脑出血后由于中性粒细胞的活化,导致 NADPH 氧化酶还原产生 O_2^-,形成氧自由基。自由基可与神经细胞膜上的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,从而导致了氧化产物 MDA 的含量增加,由于细胞膜被氧化破坏,引起细胞毒性脑水肿;自由基还可通过氧化应激使 DNA 断裂,破坏神经细胞核酸和染色体,导致细胞死亡[3];同时这些自由基也可活化金属蛋白酶,引发血脑屏障破坏,导致血管源性脑水肿[4]。由此导致了脑出血后脑水肿的加剧和神经功能缺损。

本实验结果还提示:脑出血后血肿周围组织中 TNF-α 的含量也明显上调,说明炎性反应参与了脑出血后一系列病理变化过程。这种炎性反应一方面是由于脑出血后组织坏死引起,另一方面可能与自由基诱发有关。其可能机制是:自由基活化 NF-κB[5],上调 TNF-α;诱导细胞增强 ICAM-1 的表达[6];激活磷脂酶 A_2,使细胞膜磷脂释放出花生四烯酸,导致前列腺素、白三烯增多[7],使炎性反应加剧。TNF-α 对组织损伤的可能机制如下:①增强脑血管内皮细胞一氧化氮的毒性作用,增加血管内皮的通透性,破坏血脑屏障,加重血管源性脑水肿[8]。②诱导对其敏感的细胞发生细胞毒性作用,导致细胞坏死和细胞凋亡[9]。③趋化中性粒细胞、单核及淋巴细胞,导致白细胞在局部的聚集、浸润,阻塞微血管,导致继发性缺血缺氧,进一步加重脑水肿和继发性脑损伤。

依达拉奉是亲脂性基团,对血脑屏障的通透率为60%。作为新开发的一种活性抗氧化剂,已广泛用于临床治疗缺血性脑血管病,通过清除自由基,减轻脑损伤,缩小梗死面积,对缺血脑组织发挥了神经保护作用[10]。由于脑出血后血肿周围组织中自由基活性亦显著增高;同时依达拉奉不影响血液纤维蛋白原、血小板活性,不会增加脑出血患者病灶局部出血风险。所以本实验采用依达拉奉治疗脑出血大鼠。结果显示:依达拉奉治疗组大鼠脑组织 MDA 含量显著降低,同时神经功能缺损评分、脑含水量显著改善。说明依达拉奉能够通过清除自由基的作用,减轻脑出血大鼠的脑水肿、脑损害,对出血后的脑组织具有保护作用。另外本实验结果显示,依达拉奉治疗后脑出血大鼠血肿周围组织中 TNF-α 的含量显著下调,提示依达拉奉的保护作用可能与其对炎性反应的抑制有关。作为自由基清除剂的依达拉奉是如何抑制了炎性机制的?可能是依达拉奉通过清除自由基抑制了 NF-κB 的活性,下调 TNF-α 活性;或者通过清除自由基减弱了 ICAM-1 的表达,缓解了局部炎性反应;或者通过清除自由基,减弱了其对磷脂酶 A_2 的激活,减少了花生四烯酸的释放,使前列腺素、白三烯的产生减少,缓解了炎性反应。依达拉奉对脑出血治疗的确切机制,有待于进一步的研究。

参考文献：

[1] Deinsberger W, Vogel J, Kuschinsky W, *et al*. Experimental intracerebral hemorrhage: description of a double injection model in rats[J]. Neurol Res, 1996, 18(5): 475-477.

[2] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[3] Nakamura T, Keep R F, Hua Y, *et al*. Oxidative DNA injury after experimental intracerebral hemorrhage[J]. Brain Res, 2005, 1039(1-2): 30-36.

[4] Gasche Y, Copin J C, Sugawara T, *et al*. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(12): 1393-1400.

[5] Brennan P, O'Neill L A. Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kappa B activation in three different cell lines: evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1260(2): 167-175.

[6] 张绪清. 细胞粘附分子-1表达的基因调控和影响因素[J]. 国外医学：生理、病理科学与临床分册, 1997, 17(3): 249-251.

[7] Ding-Zhou L, Marchand-Verrecchia C, Palmier B, *et al*. Neuroprotective effects of (S)-N-[4-[4-[(3,4-Dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2H-1-benzopyran-2-yl) carbonyl]-1-piperazinyl] phenyl]-2-thiophenecarboximid-amide (BN 80933), an inhibitor of neuronal nitric-oxide synthase and an antioxidant, in model of transient focal cerebral ischemia in mice[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 306(2): 588-594.

[8] Zhu D Y, Li R, Liu G Q, *et al*. Tumor necrosis factor alpha enhances the cytotoxicity induced by nitric oxide in cμltured cerebral endothelial cells[J]. Life Sci, 2000, 66(14): 1325-1335.

[9] Cong C, Hoff J T, Keep R F. Acute inflammatory reaction following experimental intracerebral hemorrhage in rat[J]. Brain Res, 2000, 871(1): 57-65.

[10] Edaravone Acute Infarction Study Group. Effect of novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters[J]. Cerebrovasc Dis, 2003, 15(3): 222-229.

（编辑 邓强庭）

文章编号：1000-5404(2007)11-1035-01

个案与短篇

肛管直肠恶性黑色素瘤14例

张 全，李靖华，曹丽叶，程树杰 （河北大学附属医院普通外科，保定 071000）

肛管直肠恶性黑色素瘤（anorectal malignant melanoma ARMM）临床上少见，治疗效果不佳，预后差。本院自1980年至2005年10月共收治原发性ARMM患者共14例，现报告如下。

14例ARMM患者中男性6例，女性8例，年龄32～78岁。按就诊时主诉，依次为血便及脓血便8例，肛管肿物3例，大便性状改变者2例，里急后重1例，占本院同期收治全部直肠肛管恶性肿瘤1 591例的0.88%。本组病例均依靠肛门直肠检查发现肛管直肠内肿瘤，病灶位于直肠下段的12例，位于肛管部2例。本组病例均采用腹会阴联合切除术（Miles术），其中有腹股沟淋巴结转移者1例附加腹股沟淋巴结清扫术。其中有6例术后应用化学药物治疗，采用VCD方案（长春新碱+环磷酰胺+氮烯咪胺）。术后发现局部复发者1例，肝转移者4例，肾转移者1例，多发转移者6例，其中生存期超过5年者1例，2年5个月者1例，2年内死亡者3例，其余9例均在1年内死亡。

讨论

肛管直肠恶性黑色素瘤是一种较为少见的恶性肿瘤，由于肛管部环形区内和肛管黏膜内存在较多量的黑色素细胞，因此，大部分恶性黑色素细胞起源于肛管，但直肠的恶性黑色素瘤的起源，一直有很大争议，近年来有人证实直肠黑色素瘤起源于直肠黏膜的黑色素细胞。本病可发生在任何年龄段，女性多于男性，临床表现无特异性，易于误诊为直肠癌。临床表现主要是便血，肛管直肠局部肿块，大便习惯改变等，其中以便血最为常见。肛门指诊可触及息肉状或结节样肿物。直肠镜检查：部分患者可以发现肿物表面由黑色或棕色的色素沉着，但该病明确诊断还需经常规的病理学检查和免疫组化检查。关于治疗方案仍存在争议，多数主张在手术治疗，包括腹会阴联合切除（APR）或局部广泛切除（WLE）的基础上，辅以化疗，放疗及免疫治疗的综合治疗方案。关于手术方式选择尚有分歧。Ross等[1]推荐能够做到充分的局部切除时用WLE，否则用APR。肛管直肠恶性黑色素瘤对化放疗敏感性差；免疫治疗可应用特异性主动免疫治疗。疾病的复发主要在手术后前24～30个月，典型复发或转移最常表现为大的盆腔肿块或弥漫性双肺结节病灶。本病的预后极差，5年生存率极低。一般多于2年内死亡，中位生存期18个月，5年生存率仅6%[2]。

关键词：肛管；直肠；恶性黑色素瘤
中图法分类号：R735.38 文献标识码：B

参考文献：

[1] Ross M, Pezzi C, Pezzi T, *et al*. Patterns of failure in anorectal melanoma. A guide to surgical therapy[J]. Arch Surg, 1990, 125(3): 313-316.

[2] Brady M S, Kavolius T P, Quan S H. Anorectal melanoma. A 64-year experience at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center[J]. Dis Colon Rectum, 1995, 38(2): 146-151.

（编辑 郭建秀）

作者简介：张 全（1974-），男，河北省保定市人，硕士，讲师，主要从事直肠癌外科治疗方面的研究。电话：13673283664

收稿日期：2006-12-12；修回日期：2007-03-27