论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1766-04

蛛网膜下腔出血脑脊液不对称二甲基精氨酸水平与脑血管痉挛的相关性研究

黄 巍,周 政,刘 俊,杨 辉,辛志成,陈军花,李 达 (第三军医大学新桥医院神经外科,重庆 400037)

摘 要:目的 观察蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)后脑脊液中不对称二甲基精氨酸(ADMA)和NO水平的动态变化,探讨ADMA含量与脑血管痉挛(cerebral vasospasm,CVS)的关系。**方法** 采用枕大池二次注血法建立SAH后脑血管痉挛动物模型,分别于术前,术后1、4、7 d行经颅多普勒超声(transcranial Doppler sonography, TCD)检查测定基底动脉脑血流速度,应用酶联免疫分析法(ELISA)和硝酸还原酶法测定不同时间脑脊液中ADMA和NO含量。**结果** ①SAH后脑脊液中ADMA浓度显著高于注血前正常水平($P<0.01$),术后4 d达到峰值后逐渐下降,而脑脊液中NO水平注血后4 d逐渐下降至最低值($P<0.01$);②SAH后血管痉挛程度逐渐加重,动脉血流第4天达到最大值后逐渐缓解,与ADMA水平时相表达一致;③SAH后脑脊液中ADMA浓度变化趋势与基底动脉血流速度相应,SAH后第4天脑脊液中ADMA浓度与NO水平呈显著负相关($r=-0.950$,$P<0.01$),与基底动脉血流速度呈显著正相关($r=0.953$,$P<0.01$)。**结论** SAH后脑血管痉挛程度与脑脊液中ADMA表达含量密切相关,SAH后脑脊液中ADMA可能通过调控NO生成水平参与了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;一氧化氮;经颅多普勒
中图法分类号: R446.14;R741.02;R743.35 **文献标识码:** A

Correlation of cerebral spinal fluid ADMA with subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm in rabbits

HUANG Wei, ZHOU Zheng, LIU Jun, YANG Hui, XIN Zhi-cheng, CHEN Jun-hua, LI Da (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the dynamical changes of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and nitric oxide (NO) in the cerebral spinal fluid (CSF) after subarachnoid hemorrhage (SAH), and access the relationship between the concentrations of ADMA and cerebral vasospasm (CVS). **Methods** An experimental cerebral vasospasm model was established by twice injections of fresh autologous arterial blood into the cisterna magna of 32 white rabbits. Another 8 rabbits receiving sham operation served as sham control. The velocity of basilar artery (BA) was measured by transcranial Doppler(TCD) before the injection and on the 1st, 4th, 7th day after twice injections. At the same time, the CSF concentrations of ADMA and NO were measured by ELISA and nitrate reductase method respectively. **Results** The concentrations of ADMA in CSF was increased significantly after the injection than that before injection($P<0.01$), and was decreased gradually after reaching the highest level on the 4th day. However, the trend of NO were quite opposite($P<0.01$). The degrees of CVS became serious after SAH and then was relieved gradually after reaching the peak flow velocity of basilar artery on the 4th day. The change of the ADMA in the CSF was synchronal with the velocity of basilar artery. On the 4th day after twice injections, the concentrations of ADMA were correlated negatively with NO level($r=-1.829$, $P<0.01$), but positively with the velocity of basilar artery($r=0.863$, $P<0.01$). **Conclusion** The degree of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage is positively related to the concentration of ADMA in cerebral spinal fluid, so measuring the concentrations of ADMA in cerebral spinal fluid after subarachnoid hemorrhage may be helpful in evaluating the development of delayed cerebral vasospasm.

Key words: subarachnoid hemorrhage; cerebral vasospasm; asymmetric dimethylarginine; nitric oxide; transcranial Doppler

作者简介: 黄 巍,男,福建省福州市人,硕士研究生,医师,主要从事脑血管疾病基础和临床方面的研究。E-mail:weihuang7678@sina.com
通信作者: 周 政,电话:(023)68774010,E-mail:bigbrain126@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-06-11;**修回日期:** 2009-06-29

自发性蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)是常见的脑血管意外,SAH 后脑血管痉挛是最严重的并发症,其发生率很高,直接影响患者的致残率和病死率。出血后蛛网膜下腔内的氧化损伤和内源性血管舒张物质 NO 的减少是脑血管痉挛(CVS)形成的重要原因。目前在心肾疾病研究领域内源性一氧化氮合成酶(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 2 次注血 SAH 动物模型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,对脑血管痉挛的发生、发展过程做进一步研究,并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　材料与方法

1.1　主要试剂及仪器

ADMA 标准品购自 Sigma 公司,ADMA ELISA 试剂盒购自 USCN LIFE SCIENCE & TECHNOLOGY 公司,NO 试剂盒购自南京建成生物工程研究所,3% 戊巴比妥钠等常规试剂由第三军医大学新桥医院中心实验室提供。Bio-Rad Model 550 酶标仪,岛津紫外可见分光光度计,EMS-9 经颅彩色多普勒诊断仪。

1.2　实验动物

4 月龄成年大白兔 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,体质量 2.0 ~ 2.5 kg,平均 2.2 kg。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　实验方法

耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠(1 ml/kg),穿刺针穿刺枕大池。取耳动脉非抗凝血 1 ml/kg,缓慢注入兔枕大池内。首次注血 48 h 后,依上法再次枕大池注血 0.8 ml/kg,此日作为蛛网膜下腔出血后 0 d。假手术组枕大池注入生理盐水 2 次,对照组无特殊处理。

1.4　标本采集

分别在术前以及 2 次注血后 1、4、7 d 经枕大池穿刺留取脑脊液标本 1.5 ml。置于预先加入 10% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)30 μl 和抑肽酶 40 μl 的试管混匀,在 4 ℃条件下 4 000 r/min 离心 10 min,分离上清液于 -70 ℃的冰箱内保存。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。

1.5　检测方法

建模成功后,于术前,术后 1、4、7 d 行经颅多普勒超声(TCD)测定基底动脉脑血流速度,血管痉挛程度判定参照 2008 年黄德章等[2]提出的标准:正常兔基底动脉的平均血流速度为 18 ~ 32 cm/s,平均值为 26.22 cm/s;轻度痉挛时,脑血流就发生明显改变,其参数值在 26 ~ 38 cm/s 之间;重度痉挛时,平均血流速度可达 49.20 cm/s 以上。应用硝酸还原法和酶联免疫法(ELISA)测定不同时间脑脊液中 NO 和 ADMA 含量。分别于相应时间点抽取 4 只兔子做心脏灌注,取基底动脉行病理观察。实验期间动物意外死亡 6 只,最后纳入统计 SAH 组动物为 14 只。

1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行重复测量数据的方差分析和单因素直线相关分析。

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、对照组实验动物精神,食欲基本正常。

2.2　术后不同时间兔脑脊液中 ADMA、NO 浓度变化

SAH 组与假手术组各时相点脑脊液中 ADMA、NO 浓度比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。SAH 组脑脊液中 NO 浓度从术后第 1 天起开始降低,第 4 天降到最低点后逐渐上升。SAH 组脑脊液中 ADMA 浓度则在术后第 1 天开始升高,第 4 天继续升高达到峰值后逐渐下降(表 1、2)。

表 1　术后不同时间各组兔脑脊液中 ADMA 浓度变化

(μmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	术后 1 d	术后 4 d	术后 7 d
正常对照组	8	0.51 ± 0.05	0.53 ± 0.07	0.50 ± 0.08
假手术组	8	0.53 ± 0.06	0.48 ± 0.09	0.50 ± 0.04
SAH 组	14	0.77 ± 0.02[a]	1.42 ± 0.01[a]	0.91 ± 0.02[a]

a: $P < 0.01$,与假手术组比较

表 2　术后不同时间各组兔脑脊液中 NO 浓度变化 (μmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	术后 1 d	术后 4 d	术后 7 d
正常对照组	8	54.87 ± 0.95	52.91 ± 1.68	53.71 ± 1.24
假手术组	8	53.84 ± 1.34	53.61 ± 1.01	54.33 ± 0.44
SAH 组	14	50.48 ± 1.32[a]	28.08 ± 0.85[a]	42.41 ± 0.42[a]

a: $P < 0.01$,与假手术组比较

2.3　术后不同时间兔颅内基底动脉血流速度的变化

SAH 组与假手术组各时相点基底动脉血流速度比较差异有统计学意义($P < 0.01$,表 3)。SAH 组术后 1、4、7 d 基底动脉峰值血流速度较术前明显增快,于 4 d 达到最高值。假手术组及对照组基底动脉峰值血流速度变化不明显。

表 3　术后不同时间各组兔基底动脉血流速度的变化

(cm/s, $\bar{x} \pm s$)

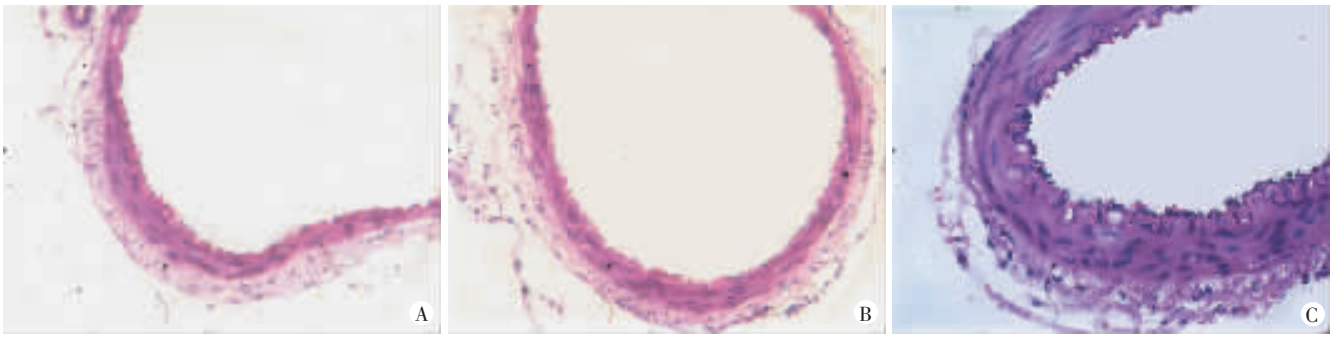
组别	n	术后 1 d	术后 4 d	术后 7 d
正常对照组	8	25.38 ± 1.30	27.14 ± 2.70	24.65 ± 3.50
假手术组	8	25.18 ± 1.34	25.24 ± 1.39	25.20 ± 1.37
SAH 组	14	36.21 ± 0.65[a]	63.24 ± 1.20[a]	40.14 ± 1.48[a]

a: $P < 0.01$,与假手术组比较



A:正常对照组; B:假手术组; C: SAH 组术后 1 d; D: SAH 组术后 4 d; E: SAH 组术后 7 d

图 1 术后不同时相点各组兔基底动脉形态学观察 (HE×100)



A:正常对照组; B:假手术组; C: SAH 组术后 4 d

图 2 术后各组兔基底动脉形态学观察 (HE×400)

2.4 病理学观察结果

低倍镜下假手术组的血管结构与正常对照组无明显差异,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。SAH 组术后 4 d 可见血管壁明显较对照组和假手术组增厚,管腔狭窄,约为正常对照组的 50%(图 1)。高倍镜下 SAH 组术后 4 d 内皮细胞不同程度的变性、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(图 2)。

2.5 脑脊液中 ADMA 与 NO 浓度、基底动脉血流速度的相关性分析

SAH 后脑脊液中 ADMA 浓度变化与脑血流速度的变化同步。ADMA 在脑脊液中浓度越高,血管痉挛越明显。SAH 后第 4 天 ADMA 与 NO 浓度呈显著负相关($r = -0.950$, $P < 0.01$),与基底动脉血流速度呈显著正相关($r = 0.953$, $P < 0.01$)。

3 讨论

脑血管痉挛的研究已有多年历史,但学说纷纭。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[3]。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,但触发、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研究。

在影响 CVS 形成和迁延的各种因素中,NO 的重要性和必要性已经得到广泛公认。研究表明,SAH 后 NO 的减少引起内皮依赖性的 NO 介导的脑血管舒张功能减退,最终导致内皮功能障碍[4]。内源性的 NO 广泛存在于血管内皮细胞和巨噬细胞等各种细胞中,由左旋精氨胍末端的氮原子与氧分子在 NOS 的催化下生成。NO 激活 cGMP 依赖的 PKC,降低细胞内的 Ca^{2+} 浓度,使血管平滑肌处于舒张状态。作为细胞间信息交换的重要载体,其参与脑血管舒张活动,对于脑血流调节意义重大。NO 合成减少的原因目前研究未有定论,Hino 等[5]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受抑制,是由于内皮细胞受损导致 eNOS 产生的 NO 减少。虽然 SAH 后脑组织以及血管组织中 eNOS 的表达是否改变仍存在争议[6],但有研究表明,在犬 SAH 后 7 d 以及大鼠 SAH 后 3 d 的痉挛基底动脉中 eNOS 的表达变化不明显[7]。而且,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。而 Jung 等[8]研究表明,内源性 eNOS 抑制物 ADMA 在蛛网膜下腔出血的脑脊液中水平呈动态变化,可能参与 NO 的生成水平的调节。我们研究结果同样证实,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 天达到最高峰逐渐回落。与国内外相关文献报道的兔脑血管痉挛的发生发展时相上较一致。

ADMA 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 202,能取代 eNOS 上的精氨酸,从而竞争性抑制 NOS 的 3 种亚型。高浓度的 ADMA 能与精氨酸竞争 Y + 运载体系统[9],从而阻断 NO 的合成,此外它们还可使 NOS 解偶联并导致过氧化物的生成[10]。蛋白质精氨酸甲基转移酶(protein arginine methyl transferase, PRMT)能催化所有蛋白质底物的精氨酸进行甲基化生成 ADMA,二甲基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 的主要代谢途径。目前体内、体外实验中均证实外源性 ADMA 能使脑血管产生收缩,大鼠模型中 10 μmol 的外源性 ADMA 可产生血管收缩。体外实验中,ADMA 能明显抑制动物或人类血管对乙酰胆碱的舒张反应,但不能抑制硝普钠引发的舒张反应,这表明了依赖 NO 的内皮舒张功能与内皮自主舒张能力的不同。近来研究已经证实在体内实验中 SAH 后痉挛的脑血管对颈内动脉注射乙酰胆碱丧失舒张反应能力[11]。这与 Furchgott 和 Zawadzki 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 后痉挛血管内膜存在 eNOS 功能障碍并引发 NO 生成水平下调。研究也证实在 SAH 后灵长目痉挛血管对颈内动脉注射 NO 或者 NO 前体物质仍能维持舒张能力[12]。本实验发现,SAH 组术后 4 d,蛛网膜下腔里 ADMA 水平较假手术组和对照组明显增加且为最高值,而此时基底动脉流速呈最高峰,ADMA 在水平及时相表达上脑血流速度的高度相关性可有力表明 ADMA 可能参与迟发性脑血管痉挛全过程。表明 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 能成为内皮功能障碍的一个重要预测因子。目前的研究方向主要集中于心血管疾病、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、便捷、安全的指标,并为脑血管痉挛治疗提供全新的药物研究方向和药物靶标。

参考文献:

[1] Pluta R M. Dysfunction of nitric oxide synthases as a cause and therapeutic target in delayed cerebral vasospasm after SAH[J]. Neurol Res, 2006, 28(7): 730 - 737.

[2] 黄德章, 王志刚, 丁　璇, 等. DSA 和 TCD 对兔蛛网膜下腔出血脑血管痉挛的评价[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2008, 34(7): 397 - 401.

[3] Crowley R W, Medel R, Kassell N F, *et al*. New insights into the causes and therapy of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage[J]. Drug Discov Today, 2008, 13(5 - 6): 254 - 260.

[4] Luliano B A, Pluta R M, Jung C, *et al*. Endothelial dysfunction in a primate model of cerebral vasospasm[J]. J Neurosurg, 2004, 100(2): 287 - 294.

[5] 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 - 568.

[6] Park K W, Metais C, Dai H B, *et al*. Microvascular endothelial dysfunction and its mechanism in a rat model of subarachnoid hemorrhage[J]. Anesth Analg, 2001, 92(4): 990 - 996.

[7] McGirt M J, Lynch J R, Parra A, *et al*. Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2002, 33(12): 2950 - 2956.

[8] Jung C S, Iuliano B A, Harvey-White J, *et al*. Association between cerebrospinal fluid levels of asymmetric dimethyl-L-arginine, an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, and cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage[J]. J Neurosurg, 2004, 101(5): 836 - 842.

[9] Maxwell A J. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases[J]. Nitric Oxide, 2002, 6(2): 101 - 124.

[10] Boger R H. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor[J]. Cardiovasc Res, 2003, 59(4): 824 - 833.

[11] Iuliano B, Pluta R M, Jung C, *et al*. Endothelial dysfunction in a primate model of cerebral vasospasm[J]. Neurosurgery, 2004, 100(2): 287 - 294.

[12] Pluta R M, Oldfield E H, Boock R J. Reversal and prevention of cerebral vasospasm by intracarotid infusions of nitric oxide donors in a primate model of subarachnoid hemorrhage[J]. J Neurosurg, 1997, 87(5): 746 - 751.

(编辑　汪勤俭)