

• 论著 •

脑出血大鼠急性期血浆及脑匀浆神经肽 Y 活性的变化

许志强 陈曼斌 蒋晓江 王景周

【摘要】 目的 观察大鼠脑出血急性期血浆及脑匀浆中神经肽 Y (NPY) 活性的动态变化, 探讨 NPY 在脑出血脑损害中的作用。**方法** Wistar 大鼠 70 只, 随机抽签法分为脑出血组及假手术对照组, 每组各 35 只; 每组再按出血前及出血后 0.5、6、12、24、48 和 72 h 分为 7 个亚组, 每亚组 5 只。分别于各时间点测定血浆和血肿周边脑组织 NPY 含量, 并观察血肿病灶区的组织形态学病理改变。**结果** 脑出血后 6 h 血浆和血肿周边脑组织 NPY 的含量开始同步升高, 并于 24 h 达峰值, 48 h 开始回落, 但至 72 h 时 NPY 的含量仍显著高于出血前 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。光镜和电镜下脑组织也发生相应的病理损害。**结论** NPY 可能参与了脑出血的病理生理过程。

【关键词】 脑出血; 神经肽 Y; 血浆; 血肿周边

中图分类号: R743.34; R363.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-0603(2004)04-0218-03

Changes of neuropeptide Y activity in plasma and brain tissue during intracerebral hemorrhage in rats XU Zhi-qiang*, CHEN Man-bi, JIANG Xiao-jiang, WANG Jing-zhou. * Third Department of Neurology, Daping Hospital, Field Surgery Institute, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

【Abstract】 Objective To evaluate the significance of changes of neuropeptide Y (NPY) activity in plasma and brain tissue during experimental intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods:** Seventy Wistar rats were randomly divided into two groups: control group and ICH group with each group subdivided into preoperation, 0.5 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours postoperation subgroups, respectively ($n = 5$). The ICH was established by infusing collagenase and heparin into rat caudate. The changes of NPY in plasma and perihematoma at preoperation, 0.5 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours after operation were observed, respectively. NPY was determined by radio-immunoassay. The morphologic change of brain was detected. **Results:** NPY activity in plasma and perihematoma increased synchronously after cerebral hemorrhage, and peaked at 24 hours, then began to reduce in 48 hours, it was still higher than those of preoperation at 72 hours after hemorrhage ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The correspondent pathological changes was observed in brain tissue under light microscope and electron microscope. **Conclusion:** NPY might be involved in the pathogenesis of cerebral hemorrhage.

【Key words】 cerebral hemorrhage; neuropeptide Y; plasma; perihematoma

CLC number: R743.34; R363.22 **Document code:** A **Article ID:** 1003-0603(2004)04-0218-03

神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 是一种含有 36 个氨基酸的多肽, 广泛分布于中枢神经系统和外周多种组织器官中, 其在神经系统中的作用越来越受到人们的重视。Allen 等^[1]发现大脑中动脉闭塞后 5 d, 梗死周围区域 NPY 表达增高, 并认为它在缺血性脑卒中脑损害的病理生理过程及治疗中有重要作用。然而, NPY 在急性脑出血血浆及血肿周边含量的变化规律和作用尚不清楚。为此, 我们采用大鼠脑出血模型, 动态观测急性脑出血大鼠血浆及血肿周

边 NPY 含量的动态变化, 并探讨 NPY 在脑出血病理生理过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料: 实验选用健康 Wistar 大鼠 70 只, 雌雄不拘, 体质量 250~300 g, 采用抽签法随机将实验动物分为脑出血组和假手术对照组, 每组 35 只, 两组动物再随机分为术前及术后 0.5、6、12、24、48 和 72 h 7 个时间点亚组, 每亚组 5 只。各组间鼠龄、性别、体质量比较均无统计学差异 (P 均 > 0.05)。动物由第三军医大学大坪医院动物中心提供。胶原酶 (V I - S 型) 由美国 Sigma 公司提供, NPY 放射免疫药盒由解放军总医院东亚免疫技术研究所提供。

1.2 大鼠脑出血动物模型的建立: 选用胶原酶加肝素联合注射方法建立脑出血动物模型^[2]。大鼠用质量分数为 0.3% 的戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 俯卧位固定于脑立体定位仪上。取头皮正

基金项目: 重庆市医药卫生重点科研基金资助项目 (2001-2003)

作者单位: 400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科三病区

作者简介: 许志强 (1970-), 男 (汉族), 福建省泉州市人, 硕士研究生, 讲师, 主治医师, 主要从事脑-内脏联合征的研究 (Email: xzq70@hotmail.com; Tel: 023-68757863)。

中切口,骨膜剥离器剥离骨膜,暴露前囟及冠状缝,选择注射点为右侧尾状核(AP1/RAT3/DV5,按照 Paxinos 和 Watson 的方法),用牙科钻钻孔,注射胶原酶和肝素,剂量选含胶原酶 1 U/ μ l(1 MU/L)和肝素 7 U/ μ l(7 MU/L)的生理盐水 1 μ l。假手术组注射等量生理盐水。注药后留针 5 min,退针缝合头皮,术后观察大鼠神经症状及体征。模型成功的评分判断根据 Longa 等^[3]的评定方法,分为 5 级:0 级为正常活动,无神经功能缺损;1 级为将大鼠尾巴提起,瘫痪侧前肢不能充分伸展;2 级为大鼠有向瘫痪侧侧旋的行为;3 级为向瘫痪侧倾倒;4 级为无自发行走,有意识障碍。脑出血组 1 级 13 只,2 级 10 只,3 级 7 只,4 级 5 只。

1.3 标本留取:取安静条件下的大鼠股静脉血,依地酸(EDTA)抗凝,4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 分离血浆,-20 $^{\circ}$ C 以下保存待测。断头处死大鼠后取脑,在沸生理盐水中煮 5 min 以灭活酶,保持肽的稳定性。分离出血肿及其周边组织(假手术组为右基底节)并称重,用 0.05 mol/L(pH 8.6)巴比妥 HCl 缓冲液(内含 1 g/L BSA, NaN₃ 1 g/L, 0.1 g Triton X-100)制成 1:10 匀浆。4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 10 min,取上清液待测。

1.4 NPY 的放射免疫测定:测定程序严格按照放射免疫药盒说明书进行,取出样品 200 μ l,加入正常血清 100 μ l,摇匀后 4 $^{\circ}$ C 放置 48 h。加入 ¹²⁵I-NPY 100 μ l,摇匀后 4 $^{\circ}$ C 放置 24 h。加入 PR 试剂 500 μ l,摇匀,室温放置 20 min。4 $^{\circ}$ C 下 3 500 r/min 离心 25 min,立即吸弃上清液,在 γ -自动计数器上进行放射活性闪烁计数,并根据有关参数,绘制标准曲线,算出样品浓度。

1.5 蛋白质定量:采用考马斯亮蓝法。

1.6 病理学观察:常规苏木素-伊红(HE)染色,光

镜下观察;电镜包埋,超薄切片,透射电镜下观察。

1.7 统计学处理:各项指标采用均数士标准差($\bar{x}\pm s$)表示。所有数据采用 Microsoft Excel 数量统计程序进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 血肿周边 NPY 活性变化:表 1 结果显示,大鼠脑出血后 0.5 h 血肿周边 NPY 活性虽然有升高趋势,但与假手术组及本组术前比较均无显著差异(*P*均>0.05)。出血后 6 h 血肿周边 NPY 活性开始显著升高(*P*<0.01),24 h 达峰值(*P*<0.01),48 h 开始回落,但 72 h NPY 活性仍显著高于出血前(*P*<0.01)。

2.2 脑出血过程中血浆 NPY 活性变化:表 2 结果显示,大鼠脑出血后 6 h 血浆 NPY 活性开始升高(*P*<0.05),24 h 达高峰(2.84 \pm 0.24) μ g/L,48 h 后逐渐下降,72 h 仍高于术前水平及假手术组相应时间点(*P*均<0.05)。

2.3 病理变化:光镜下,出血 6~12 h 病灶脑组织大片出血,大量的红细胞散在于脑组织之间,组织结构疏松;出血 24 h 病灶脑组织广泛出血,脑细胞排列紊乱,细胞皱缩、坏死,核固缩;出血 48~72 h 病灶部位可见大量坏死的脑细胞和细胞碎片,含铁血黄素散在于细胞之间,并可见血管内皮增生及小胶质细胞吞噬现象,下丘脑圆形细胞呈疏松状。电镜下超微病理发现,血肿高峰期神经元核周间隙增宽,线粒体肿胀,基质密度降低,嵴断裂,甚至消失;有髓神经纤维基质肿胀,鞘膜分离呈髓鞘样变性;毛细血管内皮细胞肿胀,胞浆空化变性,胞浆内线粒体肿胀,基质电子密度降低,内皮细胞基底膜肿胀。

3 讨论

NPY 及其受体广泛分布于哺乳动物的脑和脑血管周围,大多数 NPY 与儿茶酚胺共存于交感神

表 1 血肿周边 NPY 活性的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Changes of NPY in perihematoma($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	术前	术后 0.5 h	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h	术后 48 h	术后 72 h
假手术组	5	1.46 \pm 0.09	1.44 \pm 0.09	1.44 \pm 0.18	1.45 \pm 0.16	1.48 \pm 0.11	1.47 \pm 0.19	1.45 \pm 0.13
脑出血组	5	1.49 \pm 0.10	1.55 \pm 0.16	2.07 \pm 0.10 ^{#Δ}	3.45 \pm 0.17 ^{#Δ}	4.37 \pm 0.14 ^{#Δ}	3.84 \pm 0.14 ^{#Δ}	3.68 \pm 0.16 ^{#Δ}

注:与本组术前比较;[#]*P*<0.01;与假手术组比较; ^{Δ} *P*<0.01

表 2 血浆 NPY 活性的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Changes of NPY in plasma($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	术前	术后 0.5 h	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h	术后 48 h	术后 72 h
假手术组	5	1.66 \pm 0.28	1.84 \pm 0.12	1.71 \pm 0.32	1.68 \pm 0.43	1.61 \pm 0.21	1.62 \pm 0.28	1.69 \pm 0.20
脑出血组	5	1.62 \pm 0.49	1.78 \pm 0.19	2.23 \pm 0.24 ^{▲\star}	2.57 \pm 0.13 ^{#Δ}	2.84 \pm 0.24 ^{#Δ}	2.47 \pm 0.32 ^{▲\star}	2.18 \pm 0.11 ^{▲\star}

注:与本组术前比较;[▲]*P*<0.05,[#]*P*<0.01;与假手术组比较; ^{\star} *P*<0.05, ^{Δ} *P*<0.01

经末梢中,生理条件下二者相互制约,相互调控,对保持血管容量及弹性有重要作用,对维持机体内环境的稳定具有重要意义^[4]。病理条件下,如蛛网膜下腔出血(SAH)时这种功能失调,SAH后血浆及脑脊液 NPY 水平升高,认为这是 SAH 后血管痉挛的原因之一^[5]。而 Cheung 等^[6]的实验结果显示,缺血 6 h 后缺血周围区域 NPY 免疫反应性增加,认为 NPY 在缺血性脑卒中的脑损害病理生理过程及治疗中有重要作用。我们的实验结果表明,大鼠脑出血不同阶段 NPY 活性变化有其自身的规律。脑出血后血肿周边及血浆 NPY 活性同步增高,均于血肿明显形成的 6 h 显著增强,在出血后 24 h 达峰值,而出血 48 h 后 NPY 含量呈逐渐下降趋势。可见, NPY 活性随大鼠脑血肿的容量变化而发生动态变化,这表明 NPY 参与了脑出血的病理生理过程。

脑出血后 NPY 异常升高机制不甚清楚。林敬明等^[7]研究显示,SAH 后脑组织 NPY mRNA 水平明显升高,推测脑出血后脑组织 NPY 活性增强的重要因素之一可能是局部神经元合成所致。此外,我们认为脑组织局部 NPY 活性增强可能还与受损神经元崩解释放以及血浆渗出等因素有关。而外周血浆 NPY 含量的增高则主要与下列因素有关:①交感神经网络兴奋,交感神经末梢释放 NPY 进入血液;②脑损伤后血-脑脊液屏障破坏,受损 NPY 能神经元释放的 NPY 透过血-脑脊液屏障进入血液;③脑出血后出血灶局部启动凝血系统,血小板及纤维素凝集成血凝块,血小板聚集时释放出大量的 NPY^[8]。

NPY 参与脑出血继发性脑损害的机制尚不完全清楚,可能有:① NPY 是目前公认缩血管活性较强的肽类物质之一, NPY 的异常升高可使血肿周边脑组织主要供应血管和侧支循环收缩,脑血管阻力增加,病灶区脑灌流量减少而加重脑缺血、缺氧和脑水肿^[9],并形成恶性循环。② NPY 与 Y₂ 受体结合后,激活抑制性蛋白亚型(Gi 蛋白),后者与 GTP 结合,抑制腺苷酸环化酶的活性,使胞内环磷酸腺苷生成减少,导致神经元细胞能量代谢障碍^[10],从而加重脑组织的缺血、缺氧。③ NPY 能够促进下丘脑垂体激素的分泌^[11],最终使血浆皮质醇增加,一方面造成钠、水潴留及水、电解质紊乱,从而加重脑水肿;另一方面皮质醇本身具有神经毒性作用,它可影响葡萄糖转运及谷氨酸的摄取,对神经功能的恢复不利^[12]。④血浆 NPY 异常增高可使冠状动脉发生强

烈持续收缩痉挛,增加冠状动脉阻力,使心肌缺血、缺氧;同时 NPY 直接作用于心肌,使心肌收缩力下降,这种作用持续时间长,且不为 β 受体阻滞剂所阻滞,最终导致心排量降低,脑灌注不足,从而加重脑缺血、缺氧^[13]。

总之,我们的实验发现,脑出血急性期脑组织及血浆 NPY 活性同步升高, NPY 在脑出血继发性脑损害和脑水肿中具有重要作用。随着人们对 NPY 受体及 NPY 受体拮抗剂的进一步研究,可能为脑出血脑损害的防治提供新的手段。

参考文献:

- Allen G V, Dicarolo M A, Cechetto D F. Changes in the neurochemical organization of forebrain autonomic site following focal cerebral ischemia[J]. Soc Neurosci Abstr, 1992, 18: 1173 - 1179.
- 蒋晓江, 李书林, 许志强, 等. 生长抑素与血肿远隔区边缘叶-海马的损伤机制研究[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(8): 502 - 504.
- Longa E Z, Weinstein P R, Carson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84 - 91.
- Balasubramaniam A. Clinical potentials of neuropeptide Y family of hormones[J]. Am J Surg, 2002, 183(4): 430 - 434.
- Buki A, Horvath Z, Kallo I, et al. Peptidergic innervation of human cerebral blood vessels and saccular aneurysms[J]. Acta Neuropathol(Berl), 1999, 98(4): 383 - 388.
- Cheung R T F, Diab T, Cechetto D F, et al. Time - course of neuropeptide changes in peri - ischemic zone and amygdalar following focal ischemia in rats[J]. J Comp Neurol, 1995, 360: 101 - 120.
- 林敬明, 杨卫红, 杨金星, 等. 蛛网膜下腔出血大鼠模型脑组织中神经肽 Y mRNA 表达的变化[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(9): 779 - 781.
- 姜忠华, 钟广文, 袁晓璐, 等. 低温海水淹溺大鼠颞叶脑皮质与血浆神经肽 Y 及降压素的变化[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(10): 625 - 627.
- Chen S H, Cheung R, T. Peripheral and central administration of neuropeptide Y in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model reduces cerebral blood flow and increases infarct volume [J]. Brain Res, 2002, 927(2): 138 - 143.
- Kassis S, Olsma M, Terenius L, et al. Neuropeptide Y inhibits adenylate cyclase through a pertussis toxin - sensitive G - protein [J]. J Biol Chem, 1987, 262: 3429 - 3431.
- Jacobowitz D M. Distribution and possible functions of neuropeptides in the nervous system [J]. Nippon Yakunrigakn Zasshi, 1998, 112(Suppl): 1p - 4p.
- Fassberder K, Schmidt R, Mobner R, et al. Pattern of activation of the hypothalamic - pituitary - adrenal axis in acute stroke [J]. Stroke, 1994, 25(6): 1105 - 1108.
- 牛建立, 张新, 贾清仁, 等. 血浆神经肽 Y 水平与冠状动脉病变程度及左心室功能关系的探讨[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(10): 587 - 588.

(收稿日期: 2003 - 09 - 15 修回日期: 2004 - 02 - 23)

(本文编辑: 李银平)