

# 阿加曲班对脑出血模型大鼠脑损伤的改善作用

闫颖莉<sup>1\*</sup>, 潘广芹<sup>1</sup>, 林毅<sup>2</sup>(1.天津市武清区人民医院神经内科, 天津 301700; 2.天津市武清区人民医院消化内科, 天津 301700)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2644-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.16

**摘要** 目的:研究阿加曲班对脑出血模型大鼠脑损伤的改善作用。方法:取50只SD大鼠随机均分为正常对照(等量生理盐水)组、模型(等量生理盐水)组和阿加曲班低、中、高剂量(0.75、1.5、3 mg/kg)组,除正常对照组外其余各组大鼠复制脑出血模型。复制模型30 min后各组大鼠ip给予相应药物,每天1次,连续给药3 d。处死大鼠,检测各组大鼠脑组织中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 $1\beta$ (IL- $1\beta$ )含量,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)活性,Bcl-2、Bax、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9蛋白表达和核转录因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 的磷酸化水平。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠脑组织中TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$ 含量增加,Caspase-3活性和MMP-2、MMP-9、Bax蛋白表达增强,Bcl-2蛋白表达减弱,NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化水平升高,差异均具有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,阿加曲班低、中、高剂量组大鼠脑组织中TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$ 含量减少,Caspase-3活性和MMP-2、MMP-9、Bax蛋白表达减弱,Bcl-2蛋白表达增强,NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化水平降低,差异均具有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),且与剂量呈正相关。结论:阿加曲班呈剂量依赖性地抑制脑出血模型大鼠炎症因子分泌及脑组织细胞凋亡,其作用可能与NF- $\kappa$ B信号通路有关。

**关键词** 阿加曲班;脑出血;大鼠;炎症;细胞凋亡;核转录因子 $\kappa$ B信号通路

## Improving Effects of Argatroban on the Brain Damage of Model Rats with Cerebral Hemorrhage

YAN Ying-li<sup>1</sup>, PAN Guang-qin<sup>1</sup>, LIN Yi<sup>2</sup>(1.Dept. of Neurology, the People's Hospital of Tianjin Wuqing District, Tianjin 301700, China; 2.Dept. of Gastroenterology, the People's Hospital of Tianjin Wuqing District, Tianjin 301700, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the improving effects of argatroban on the brain damage of model rats with cerebral hemorrhage. METHODS: 50 SD rats were randomly divided into normal control group (equivalent normal saline), model group (equivalent normal saline), argatroban high, medium and low dose groups (0.75, 1.5, 3 mg/kg). All groups, except for normal control group, were reproduced models with cerebral hemorrhage, and the rats in each group were treated by corresponding drugs after 30 min, ip, once a day. The rats were executed after continuous administration for 3 days. The data was detected, including the contents of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), activity of cysteine-containing aspartic protease 3 (Caspase-3), expressions of Bcl-2, Bax, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9, and the phosphorylations of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 and I $\kappa$ B $\alpha$ . RESULTS: Compared with the normal control group, the contents of TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$ , the activity of Caspase-3, the expressions of MMP-2, MMP-9 and Bax proteins were increased; the expression of Bcl-2 was decreased; and phosphorylations of NF- $\kappa$ B p65 and I $\kappa$ B $\alpha$  in model group were increased, with significant differences ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the contents of TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$ , the activity of Caspase-3, the expressions of MMP-2, MMP-9 and Bax were decreased; the expression of Bcl-2 was increased; and phosphorylations of NF- $\kappa$ B p65 and I $\kappa$ B $\alpha$  in argatroban low, medium and high dose groups were decreased, with significant differences ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). And it was positively correlated with the dose. CONCLUSIONS: Argatroban has dose-dependent inhibition effects on the inflammatory cytokine secretion and apoptosis of brain tissue of model rats with brain hemorrhage, and the mechanism may be related to NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**KEYWORDS** Argatroban; Cerebral hemorrhage; Rats; inflammation; Cell apoptosis; NF- $\kappa$ B signaling pathway

脑出血(Cerebral hemorrhage)是一种多发病,其30 d病死率为35%~50%,绝大多数存活者会遗留严重的神经功能缺损症状,仅20%的患者于发病后6个月生活可自理<sup>[1]</sup>。ICH的病理变化是一个多因素参与的复杂过程,继发性损伤也是其原因之一。脑出血继发性脑损伤包括脑水肿、炎症反应和细胞死亡<sup>[2]</sup>。

阿加曲班(Argatroban)是近年来发现的一种小分子凝血酶抑制剂,其对用胶原酶IV诱导的脑出血模型大鼠脑水肿具有抑制作用<sup>[3]</sup>。在血肿局部应用阿加曲班可抑制金属基质蛋

白酶(MMPs)、减少血脑屏障破坏、减轻脑水肿,在脑室内应用阿加曲班也可减轻大鼠脑出血后的神经细胞凋亡<sup>[4]</sup>。据此推论,阿加曲班可能减轻包括炎症反应、细胞凋亡在内的继发性脑损伤,但其具体机制未知。因此,笔者将探讨阿加曲班对脑出血模型大鼠脑损伤的改善作用。

## 1 材料

### 1.1 仪器

DYY-7C型电泳仪(北京六一仪器厂);ChemiDoc™ XRS型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);Infinite F50型酶标仪(瑞士Tecan公司);5417R型离心机(美国Eppendorf公司)。

### 1.2 药品与试剂

\* 主治医师。研究方向:神经内科。E-mail: yanyingli98@163.com

阿加曲班注射液(三菱制药广州有限公司,批号:20111212,规格:10 mg:20 ml);兔抗Bcl-2、Bax、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9和核转录因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)p65、磷酸化p65(p-p65)、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 抗体(美国Epitomics公司);半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司);白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )检测试剂盒、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )检测试剂盒(美国RB公司);小鼠抗 $\beta$ -actin抗体(上海碧云天生物技术研究所)。

### 1.3 动物

清洁级SD大鼠, $\delta$ ,体质量(200 $\pm$ 20)g,购于上海斯莱克实验动物有限公司,实验动物生产合格证号:SCXK(沪)200700560605。室内温度为(23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,大鼠自由饮食和饮水。

## 2 方法

### 2.1 复制ICH模型

参照黄艳等<sup>[1]</sup>报道的方法复制模型,取大鼠以10%水合氯醛腹腔麻醉后断尾取血,抗凝血后,用微量注射器从鼠尾抽取50  $\mu$ l,在立体定向仪引导下缓慢注入左侧尾状核进针5 mm、时间5 min左右,停留10 min,之后缓慢退针。

### 2.2 分组与给药

取SD大鼠50只随机分成5组,每组10只,即正常对照(等量生理盐水)组、模型(等量生理盐水)组和阿加曲班低、中、高剂量(0.75、1.5、3 mg/kg)组。除正常对照组外,其余各组大鼠复制脑出血模型。各组大鼠术后30 min开始ip给予相应药物,每天1次,连续3 d。

### 2.3 标本的收集与处理

连续给药3 d后,大鼠ip给予10%水合氯醛进行麻醉,断头后迅速剪开头部皮肤,去除周围肌肉,小心打开颅内骨暴露新鲜脑组织,去除软脑膜、脑干、小脑及嗅球。迅速用生理盐水冲洗脑组织表面血液后,将脑组织立即放入标记好的冻存管中,并投入液氮罐中,待用。

### 2.4 脑组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量测定

取各组大鼠脑组织,按试剂盒说明书要求操作,检测其中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量。

### 2.5 脑组织中Caspase-3活性检测

用胶原酶裂解脑组织,收集细胞,加入预冷的50  $\mu$ l裂解液,吹打均匀,置冰上裂解40 min左右,其间涡旋振荡3~4次,每次10 s,4  $^{\circ}$ C下以离心半径为15 cm、10 000 r/min离心1 min,吸取上清,放置冰上待用。取1~2  $\mu$ l上清,检测其中的蛋白浓度,后吸取50  $\mu$ l含100~200  $\mu$ g蛋白的细胞裂解上清,加入50  $\mu$ l反应液,加入5  $\mu$ l Caspase-3底物,于37  $^{\circ}$ C避光孵育4 h。用酶标仪测定405 nm波长处的吸光度,以其与正常对照组吸光度的比值为各组大鼠脑组织中Caspase-3的相对活性。

### 2.6 脑组织中NF- $\kappa$ B信号通路及相关因子的检测

取适量脑组织,加入RIPA强裂解液,裂解,离心,收获蛋白。采用二喹啉甲酸(BCA)试剂盒对蛋白浓度进行测定。蛋白上样,进行十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶电泳,湿法转膜,加入兔抗Bcl-2、Bax、MMP-2、MMP-9和NF- $\kappa$ B p65、p-p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 单抗孵育,4  $^{\circ}$ C过夜,漂洗后,滴加增强化学发光(ECL)曝光液,在凝胶成像系统中曝光。用Quantity one软件对各抗体条带灰度值进行统计,以Bcl-2、Bax、MMP-2、MMP-9与 $\beta$ -actin条带灰度值的比值表示相应蛋白的相对表达含量,以NF- $\kappa$ B p-p65与p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 与I $\kappa$ B $\alpha$ 的灰度值比值表示NF- $\kappa$ B

p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 的磷酸化水平。

## 2.7 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行分析处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用*t*检验,多组间用单因素方差分析(One-way ANOVA)。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 大鼠脑组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量测定结果

与正常对照组比较,模型组大鼠脑组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量增加,差异具有统计学意义(*P*<0.01)。与模型组比较,阿加曲班低、中、高剂量组大鼠脑组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量减少,差异具有统计学意义(*P*<0.01或*P*<0.05)。与阿加曲班低剂量组比较,阿加曲班中、高剂量组大鼠脑组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量减少;与阿加曲班中剂量组比较,阿加曲班高剂量组大鼠脑组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量减少,差异均具有统计学意义(*P*<0.01或*P*<0.05)。各组大鼠脑组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量测定结果见表1。

表1 各组大鼠脑组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量测定结果( $\bar{x} \pm s$ , *n*=10)

Tab 1 Determination results of contents of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in rats brain tissue of each group( $\bar{x} \pm s$ , *n*=10)

组别	TNF- $\alpha$ , ng/g	IL-1 $\beta$ , ng/g
正常对照组	5.98 $\pm$ 1.21	6.23 $\pm$ 0.35
模型组	12.59 $\pm$ 2.45*	18.29 $\pm$ 0.96*
阿加曲班低剂量组	9.76 $\pm$ 0.48 <sup>#</sup>	15.16 $\pm$ 0.88 <sup>#</sup>
阿加曲班中剂量组	8.35 $\pm$ 1.25 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	10.52 $\pm$ 1.87 <sup>##</sup>
阿加曲班高剂量组	6.67 $\pm$ 1.19 <sup>##<math>\Delta</math><math>\square</math></sup>	8.75 $\pm$ 1.09 <sup>##<math>\Delta</math><math>\square</math></sup>

注:与正常对照组比较,\**P*<0.01;与模型组比较,<sup>#</sup>*P*<0.05,<sup>##</sup>*P*<0.01;与阿加曲班低剂量组比较, <sup>$\Delta$</sup> *P*<0.05, <sup>$\Delta$</sup> *P*<0.01;与阿加曲班中剂量组比较, <sup>$\square$</sup> *P*<0.05

Note: vs. normal control group, \**P*<0.01; vs. model group, <sup>#</sup>*P*<0.05, <sup>##</sup>*P*<0.01; vs. argatroban low dose group,  <sup>$\Delta$</sup> *P*<0.05,  <sup>$\Delta$</sup> *P*<0.01; vs. argatroban medium dose group,  <sup>$\square$</sup> *P*<0.05

### 3.2 大鼠脑组织中Caspase-3活性测定结果

与正常对照组比较,模型组大鼠脑组织中Caspase-3活性增强,差异具有统计学意义(*P*<0.01)。与模型组比较,阿加曲班低、中、高剂量组大鼠脑组织中Caspase-3活性减弱,差异具有统计学意义(*P*<0.01)。与阿加曲班低剂量组比较,阿加曲班中、高剂量组大鼠脑组织中Caspase-3活性减弱;与阿加曲班中剂量组比较,阿加曲班高剂量组大鼠脑组织中Caspase-3活性减弱,差异均具有统计学意义(*P*<0.05)。各组大鼠脑组织中Caspase-3活性测定结果见图1。

### 3.3 大鼠脑组织中MMP-2、MMP-9蛋白表达测定结果

与正常对照组比较,模型组大鼠脑组织中MMP-2、MMP-9蛋白表达增强,差异具有统计学意义(*P*<0.01)。与模型组比较,阿加曲班低、中、高剂量组大鼠脑组织中MMP-2、MMP-9蛋白表达减弱,差异具有统计学意义(*P*<0.01或*P*<0.05)。与阿加曲班低剂量组比较,阿加曲班中、高剂量组大鼠脑组织中MMP-2、MMP-9蛋白表达减弱;与阿加曲班中剂量组比较,阿加曲班高剂量组大鼠脑组织中MMP-2、MMP-9蛋白表达减弱,差异均具有统计学意义(*P*<0.01或*P*<0.05)。各组大鼠脑组织中MMP-2、MMP-9蛋白表达电泳图见图2,蛋白表达测定结果见表2。

### 3.4 脑组织凋亡相关蛋白表达测定结果

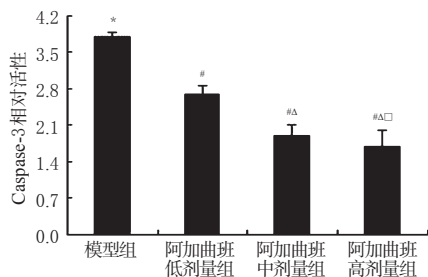


图1 各组大鼠脑组织中Caspase-3活性测定结果

注:与正常对照组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.01$ ;与阿加曲班低剂量组比较,Δ $P<0.05$ ;与阿加曲班中剂量组比较,□ $P<0.05$

Fig 1 Determination results of activity of Caspase-3 in rat brain tissue of each group

Note: vs. normal control group, \* $P<0.01$ ; vs. model group, # $P<0.01$ ; vs. argatroban low dose group, Δ $P<0.05$ ; vs. argatroban medium dose group, □ $P<0.05$

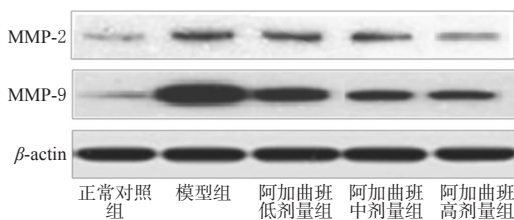


图2 各组大鼠脑组织中MMP-2、MMP-9蛋白表达电泳图

Fig 2 Electrophoresis of expressions of MMP-2 and MMP-9 proteins in rats brain tissue of each group

表2 各组大鼠脑组织中MMP-2、MMP-9蛋白表达测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 2 Determination results of expressions of MMP-2 and MMP-9 proteins in rats brain tissue of each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	MMP-2/ $\beta$ -actin	MMP-9/ $\beta$ -actin
正常对照组	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.03
模型组	0.38 ± 0.04*	5.18 ± 0.14*
阿加曲班低剂量组	0.27 ± 0.02#	1.79 ± 0.56#
阿加曲班中剂量组	0.29 ± 0.05#	0.92 ± 0.23#Δ
阿加曲班高剂量组	0.17 ± 0.06#Δ□	0.74 ± 0.11#Δ□

注:与正常对照组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,# $P<0.01$ ;与阿加曲班低剂量组比较,Δ $P<0.05$ ,Δ $P<0.01$ ;与阿加曲班中剂量组比较,□ $P<0.05$

Note: vs. normal control group, \* $P<0.01$ ; vs. model group, # $P<0.05$ ,# $P<0.01$ ; vs. argatroban low dose group, Δ $P<0.05$ ,Δ $P<0.01$ ; vs. argatroban medium dose group, □ $P<0.05$

与正常对照组比较,模型组大鼠脑组织中Bax蛋白表达增强,Bcl-2蛋白表达减弱,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,阿加曲班低、中、高剂量组大鼠脑组织中Bax蛋白表达减弱,Bcl-2蛋白表达增强,差异具有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。与阿加曲班低剂量组比较,阿加曲班中、高剂量组大鼠脑组织中Bax蛋白表达减弱,Bcl-2蛋白表达增强;与阿加曲班中剂量组比较,阿加曲班高剂量组大鼠脑组织中Bax蛋白表达减弱,Bcl-2蛋白表达增强,差异均具有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。各组大鼠脑组织中Bax、Bcl-2蛋白表达电泳图见图3,蛋白表达测定结果见表3。

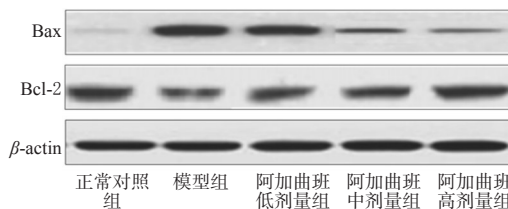


图3 各组大鼠脑组织中Bax、Bcl-2蛋白表达电泳图

Fig 3 Electrophoresis of expressions of Bax and Bcl-2 proteins in rats brain tissue of each group

表3 各组大鼠脑组织中Bax、Bcl-2蛋白表达测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 3 Determination results of expressions of Bax and Bcl-2 proteins in rats brain tissue of each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	Bax/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin
正常对照组	0.03 ± 0.00	2.59 ± 0.76
模型组	2.27 ± 0.34*	0.76 ± 0.15*
阿加曲班低剂量组	1.39 ± 0.48#	0.89 ± 0.26#
阿加曲班中剂量组	0.78 ± 0.15#ΔΔ	1.13 ± 0.27#ΔΔ
阿加曲班高剂量组	0.37 ± 0.10#ΔΔ□	2.03 ± 0.59#ΔΔ□

注:与正常对照组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,# $P<0.01$ ;与阿加曲班低剂量组比较,Δ $P<0.05$ ,Δ $P<0.01$ ;与阿加曲班中剂量组比较,□ $P<0.05$

Note: vs. normal control group, \* $P<0.01$ ; vs. model group, # $P<0.05$ ,# $P<0.01$ ; vs. argatroban low dose group, Δ $P<0.05$ ,Δ $P<0.01$ ; vs. argatroban medium dose group, □ $P<0.05$

### 3.5 脑组织中NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化水平测定结果

与正常对照组比较,模型组大鼠脑组织中NF- $\kappa$ B p-p65/p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 比值增加,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,阿加曲班低、中、高剂量组大鼠脑组织中NF- $\kappa$ B p-p65/p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 比值降低,差异具有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。与阿加曲班低剂量组比较,阿加曲班中、高剂量组大鼠脑组织中NF- $\kappa$ B p-p65/p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 比值降低;与阿加曲班中剂量组比较,阿加曲班高剂量组大鼠脑组织中NF- $\kappa$ B p-p65/p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 比值降低,差异均具有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。各组大鼠脑组织中NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白的表达电泳图见图4,NF- $\kappa$ B p-p65/p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 比值测定结果见表4。

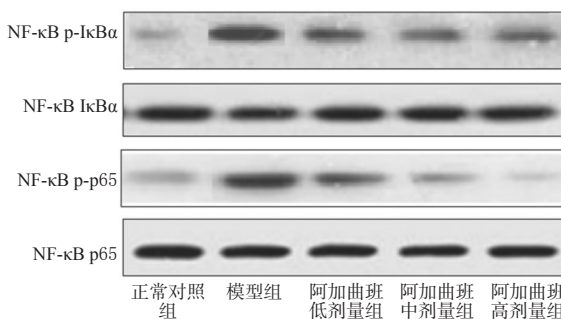


图4 各组大鼠脑组织中NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白的表达电泳图

Fig 4 Electrophoresis of expressions of proteins related to NF- $\kappa$ B signaling pathway in rats brain tissue of each group

表4 各组大鼠脑组织中NF-κB p-p65/p65、p-IκBα/IκBα比值测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 4 Determination results of NF-κB p-p65/p65 and p-IκBα/IκBα in rats brain tissue of each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	NF-κB p-p65/p65	NF-κB p-IκBα/IκBα
正常对照组	0.18 ± 0.03	0.23 ± 0.03
模型组	1.91 ± 0.29*	1.09 ± 0.14*
阿加曲班低剂量组	0.76 ± 0.17 <sup>#</sup>	0.56 ± 0.11 <sup>#</sup>
阿加曲班中剂量组	0.49 ± 0.15 <sup>#Δ</sup>	0.32 ± 0.07 <sup>#Δ</sup>
阿加曲班高剂量组	0.47 ± 0.10 <sup>#Δ□</sup>	0.25 ± 0.04 <sup>#Δ□</sup>

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>#</sup> $P < 0.01$ ;与阿加曲班低剂量组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$ ;与阿加曲班中剂量组比较,<sup>□</sup> $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, \* $P < 0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>#</sup> $P < 0.01$ ; vs. argatroban low dose group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ , <sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$ ; vs. argatroban medium dose group, <sup>□</sup> $P < 0.05$

#### 4 讨论

脑出血是一种危害人类生命和健康的神经系统疾病,具有起病急、病死率和致残率都很高的特点,多发生于老年人<sup>[2]</sup>。而如今临床上治疗方法仍较单一,尽管部分脑出血患者都幸存了下来,但因遗留有不同程度的神经功能障碍而严重影响了生活质量,给患者家庭及社会都带来了一定的负担。因此探讨脑出血后出血灶周围损伤机制,对寻找和开发治疗脑出血的新药物有着非常重要的意义。

大量的研究表明,脑出血后周围组织存在明显的炎症反应和多种机制导致的细胞凋亡,并受多种信号通路调控,NF-κB信号通路就是其中之一<sup>[5]</sup>。在脑出血模型中,血肿周围组织NF-κB表达水平显著升高,并可上调炎症细胞因子如IL-1、TNF-α等的表达<sup>[6]</sup>。本研究发现,在脑出血模型大鼠脑组织中,NF-κB p65及上游蛋白IκBα磷酸化显著,给予一定剂量阿加曲班后,可显著抑制此变化,与丛玉玮等<sup>[6]</sup>的观点一致。

NF-κB调节炎症过程的关键转录因子有MMPs、IL-1β及TNF-α。MMPs降解基膜,引起血管通透性的增加,中性粒细胞、巨噬细胞从受损血管溢出,释放炎症介质。IL-1β主要由单核巨噬细胞产生,与脑出血密切相关。TNF-α是一种主要由激活的单核/巨噬细胞分泌的炎症细胞因子。脑出血患者血液中检测出MMP-2、MMP-9表达明显增强,尤其是MMP-9与脑水肿及预后有明显关系<sup>[7]</sup>。脑出血患者早期血浆TNF-α、IL-1β含量升高,并持续一段时间<sup>[8]</sup>。已有文献报道阿加曲班可以减轻大鼠脑出血后血肿周围的炎症细胞浸润<sup>[3,6]</sup>。本实验研究证实,脑出血后大鼠血肿周围脑组织TNF-α、IL-1β、MMP-2、MMP-9表达明显增强,给予一定剂量阿加曲班可显著抑制此变化。

脑出血后血肿周围存在细胞凋亡被许多研究证实。在脑内注入5u凝血酶后,在注入区可检测到DNA碎片和末端脱氧核糖苷酸转移酶介导的脱脲苷三磷酸末端标记法(TUNEL)阳性细胞,凋亡高峰出现在第1天<sup>[9]</sup>。近年来研究也表明,Caspase-3家族在缺血性脑损伤中发挥了重要作用,Caspase-3的表达与大鼠脑血肿周围脑组织凋亡呈正相关。线粒体是细胞的能量转换器,为细胞的生命活动提供基础能力,是主要合成三磷酸腺苷(ATP)的场所。脑出血后,出血灶周围细胞受损,细胞内细胞超微结构如线粒体和内质网损伤,线粒体功能减弱,蛋白合成受到影响,启动凋亡程序,导致细胞死亡。研究显示,

Bcl-2和Bax蛋白对脑出血后细胞凋亡有重要的影响。在凝血酶诱导的大鼠脑缺血模型中,Bax表达减弱,Bax表达增强<sup>[10]</sup>。本实验研究证实,脑出血后血肿周围脑组织Caspase-3活性显著增强、Bax表达明显增强、Bcl-2表达减弱,给予一定剂量阿加曲班可显著抑制此变化。

综上所述,在脑出血大鼠脑组织中,通过给予一定剂量阿加曲班,可显著抑制脑组织炎症及细胞凋亡,从而保护脑出血模型大鼠脑损伤。这一作用是通过降低TNF-α、IL-1β、MMP-2、MMP-9炎症因子含量,抑制Caspase-3活性,下调Bax表达,上调Bcl-2表达来实现的,可能与NF-κB信号通路有关。

#### 参考文献

- [1] 黄艳,王波,董志,等.西维来司钠对脑出血模型大鼠脑组织损伤的保护作用研究[J].中国药房,2013,24(41):3879.
- [2] Etminan N, Vergouwen MD, Ildodigwe D, et al. Effect of pharmaceutical treatment on vasospasm, delayed cerebral ischemia, and clinical outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(6):1443.
- [3] 周中和,曲方,李晓秋,等.经腹腔应用阿加曲班对脑出血后凝血酶神经毒性的抑制作用[J].中国临床神经科学,2011,19(2):161.
- [4] Li G, Fan RM, Chen JL, et al. Neuroprotective effects of argatroban and C5a receptor antagonist (PMX53) following intracerebral haemorrhage[J]. *Clin Exp Immunol*, 2014,175(2):285.
- [5] Zhou ML, Shi JX, Hang CH, et al. Potential contribution of nuclear factor-kappaB to cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007,27(9):1583.
- [6] 丛玉玮,戚基萍,吴鹤,等.阿加曲班对实验性大鼠出血后脑组织NF-κB表达变化的研究[J].卒中与神经疾病,2008,15(1):34.
- [7] Hernandez-Guillamon M, Martinez-Saez E, Delgado P, et al. MMP-2/MMP-9 plasma level and brain expression in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke[J]. *Brain Pathol*, 2012,22(2):133.
- [8] Sudduth TL, Powell DK, Smith CD, et al. Induction of hyperhomocysteinemia models vascular dementia by induction of cerebral microhemorrhages and neuroinflammation [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013,33(5):708.
- [9] Zheng M, Zhu H, Gong Y, et al. Involvement of GMRP1, a novel mediator of Akt pathway, in brain damage after intracerebral hemorrhage[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013,6(2):224.
- [10] 李鹏,陶陶,罗开俭.依达拉奉对兔脑出血后血肿周围组织中Bax及Bcl-2蛋白表达的影响[J].第三军医大学学报,2014,36(6):596.

(收稿日期:2015-02-06 修回日期:2015-03-17)

(编辑:邹丽娟)