

尤瑞克林对心脏骤停后综合征兔脑保护作用的研究

李昌盛¹, 闵喆², 杨贤义¹, 郭辉¹, 柴林¹, 肖敏¹

摘要 **目的:**探讨尤瑞克林(UK)对心脏骤停后综合征(PCAS)兔脑的保护作用及机制。**方法:**将42只日本大耳白兔随机分为假手术组(n=6)、PCAS组(n=12)、UK大剂量(UK-H)组(n=12)、UK小剂量(UK-L)组(n=12)。采用窒息性心脏骤停法制备兔PCAS模型,假手术组不造成窒息。复苏成功后UK-H、UK-L组立即给予UK 17.5×10⁻³PNAU/kg、3.5×10⁻³PNAU/kg,PCAS组注射等量生理盐水。分别于复苏前、复苏后6 h、24 h、48 h检测血清神经元特异性烯醇化酶(NSE),并进行神经功能缺损评分。48 h后取兔脑组织,应用Western blot方法测定脑组织Caspase-3、Caspase-9表达。**结果:**与假手术组比,PCAS组、UK-H组、UK-L组血清NSE水平在复苏后6 h、24 h、48 h均明显升高(P<0.01)。与PCAS组比,UK-H组、UK-L组血清NSE水平、神经功能损伤评分在复苏后24 h、48 h明显减少,复苏后48 h Caspase-3、Caspase-9表达水平减低(P<0.05),且在复苏后48 h UK-H组较UK-L组减低更为明显(P<0.05)。**结论:**UK能减少复苏后脑炎症因子表达,改善神经功能,其机制可能与抑制细胞凋亡有关。

关键词 心脏骤停后综合征;尤瑞克林;炎症;凋亡

中图分类号 R741;R741.05 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.05.002

Brain Protective Effects of Urinary Kallidinogenase in Rabbits with Post-cardiac Arrest Syndrome LI Chang-sheng¹, MIN Zhe², YANG Xian-yi¹, GUO Hui¹, CHAI Lin¹, XIAO Min¹. 1.Department of Emergency, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Hubei 442000, China; 2.Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract **Objective:** To investigate the brain protective effects and mechanism of urinary kallidinogenase (UK) in rabbits with post-cardiac arrest syndrome (PCAS). **Methods:** Japanese white rabbits were random divided into the sham group (n=6), PCAS group (n=12), UK high-dose group (UK-H group, n=12), and UK low-dose group (UK-L group, n=12). PCAS models were established by using asphyxia-induced cardiac arrest; the sham group was not subjected to asphyxia. Immediately after ROSC, UK-H and UK-L groups were given 17.5×10⁻³ PNAU/kg and 3.5×10⁻³ PNAU/kg doses of UK, and the PCAS group was injected with an equal amount of saline. Serum level of neuron specificity enolization enzyme (NSE) was examined before ROSC and 6 h, 24 h, and 48 h after ROSC respectively. Functional outcomes were measured by neurological deficit score. Rabbit brain tissue was collected after 48 h, and Western blot was performed to determine brain tissue Caspase-3 and Caspase-9 expression. **Results:** Compared to the sham group, serum level of NSE was significantly elevated in the PCAS group, UK-L group, and UK-H group 6 h, 24 h, and 48 h after ROSC (P<0.01). Compared to PCAS group, serum level of NSE and neurological deficit score was clearly decreased in the UK-L group and UK-H group 24 h and 48 h after ROSC; the expression level of Caspase-3 and Caspase-9 was significantly attenuated in the two groups 48 h after ROSC (P<0.05), with the UK-H group showing a greater reduction than the UK-L group (P<0.05). **Conclusion:** UK reduced brain inflammation and alleviated neurological deficit, and the mechanism may be related to inhibition of apoptosis.

Key words post-cardiac arrest syndrome; urinary kallidinogenase; inflammation; apoptosis

心脏骤停后综合征(post-cardiac arrest syndrome, PCAS)是指心肺复苏后引起的全身多器官功能障碍^[1],其中以脑功能障碍最难恢复。脑功能障碍的核心是全脑缺血再灌注损伤^[2]。目前为止,心肺复苏后脑保护唯一公认有效的治疗仍是亚低温治疗,尚无有效的神经保护剂广泛应用于心肺复苏脑保护治疗^[3]。尤瑞克林(urinary Kallidinogenase, UK)主要成分为人尿激肽原酶,能分解产生血管缓

激肽和血管舒张素。已有研究表明^[4,5],UK能减少局灶性脑缺血体积,减轻神经功能损伤,其机制可能与促进血管新生和神经细胞增殖、迁移、分化、减少细胞凋亡等有关。目前关于UK应用于PCAS的研究及其脑保护作用机制国内外未见报道。本研究拟从细胞凋亡角度探讨UK对PCAS的保护作用,为UK在心肺复苏脑保护中的临床应用提供依据。

作者单位

1. 十堰市太和医院 (湖北医药学院附属医院)急诊医学科
湖北 十堰 442000

2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科
武汉 430030

基金项目

湖北省自然科学基金面上项目 (No.2010CDB09103)

收稿日期

2017-12-14

通讯作者

肖敏

xm@hbmh.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与分组 所有动物实验遵照 1996 版《美国实验动物使用指引》(NIH Publication No.80-23)的要求进行,并获得湖北医药学院动物伦理委员会的批准。42 只雄性 6 月龄日本大耳白兔由湖北省实验动物研究中心提供,平均体质量(2.35±0.19)kg。按随机数字表法分为 4 组:假手术组(6 只)、PCAS 组(12 只)、UK 大剂量 (high-dose group, UK-H) 组(12 只)、UK 小剂量 (low-dose group, UK-L) 组(12 只)。

1.1.2 主要设备 飞利浦心电监护仪,有创动脉血压压力转换器,小动物呼吸机(购于深圳瑞沃德生命科技有限公司,11012VMR),24 号留置针,新生儿气管插管,新生儿导尿管,新生儿胃管,净化工作台、离心机。

1.1.3 主要试剂 UK(0.15 PNAU/瓶,购于广东天普生化医药股份有限公司)、定量 PCR 试剂盒为美国 MBI 公司产品,Caspase-3、Caspase-9 等抗体购自美国杰美基因公司,氯化琥珀胆碱、氯胺酮注射液、肾上腺素、苏 3 号、碳酸氢钠、10%糖盐水、5%氨基酸、肌酐、维生素 C、青霉素、多聚甲醛。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 用气管夹闭窒息法制备 PCAS 动物模型,依据文献^[6]方法进行:氯胺酮注射液 0.24 mL/kg 麻醉后固定,进行心电监护。用 24 号留置针穿刺股动脉,连接飞利浦监护起搏仪监测血压和心率。逆行气管插管,固定气管导管。心率、呼吸、血压稳定 5 min 后(以此作为实验计时点,即 0 h),采集动物血液、备用。假手术组只做麻醉和插管,其他 3 组通过耳缘静脉静注氯化琥珀胆碱 1 mg/kg,夹闭气管导管直至心跳骤停。以动脉血压失去波动呈一条直线或平均动脉压 18 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)作为心脏骤停的判断标准。心跳停止 5 min 后进行复苏,呼吸机辅助呼吸(频率 35 次/min,潮气量 10 mL/kg,气道压力 0~1 cmH₂O,同时行胸外心脏按压,频率 180~220 次/min,静注肾上腺素 0.25 mg/kg,每 3 min 一次;5%碳酸氢钠 2 mL/kg,每 30 min 一次,连续 4 次;苏 3 号肌注 0.24 mL/kg。复

苏成功标准:心肺复苏持续 10 min,动物恢复自主循环(return of spontaneous circulation, ROSC)持续 10 min 以上。注射用 UK 以灭菌生理盐水稀释,复苏成功后 UK-H、UK-L 组立即经耳缘静脉给予 17.5×10⁻³PNAU/kg、3.5×10⁻³ PNAU/kg,每日 1 次;PCAS 组注射同等剂量生理盐水^[7]。

1.2.2 神经元特异性烯醇化酶(neuron specificity enolization enzyme,NSE)检测 分别于复苏前、复苏后 6 h、24 h、48 h 检测血清 NSE 水平。

1.2.3 神经功能损伤评分 按照 Purdy PD^[8]神经功能缺损评分表分别于复苏后 6 h、24 h、48 h 对家兔的意识、行为、转头、转圈及偏盲五方面进行神经功能缺损评分。总得分最低为 2 分,表示完全正常,无神经功能缺陷;总得分最高为 11 分,表示动物意识丧失或死亡。

1.2.4 Caspase-3、Caspase-9 表达 Western blot 检测 复苏成功后 48 h 麻醉处死动物,迅速剥离颅骨取出脑组织置于冰器皿上,分离出大脑皮质,置于液氮罐冻存。检测前先将脑组织称重,约 100 mg,常规方法提取脑组织蛋白,8%SDS-PAGE 电泳后转膜和封闭。用羊抗兔 Caspase-3、Caspase-9 克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗孵育,DAB 显色;37 ℃PBS 终止显色、照像。结果用分析软件 Image J 进行处理,Actin 为内参,比值结果表示其蛋白的相对含量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,均采用单因素方差分析和 Dunnett-*t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组家兔基本情况比较

PCAS 组、UK-H 组、UK-L 组各时间点存活率差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

2.2 各组血清 NSE 水平比较

PCAS 组、UK-H 组、UK-L 组血清 NSE 水平在复苏后 6 h、24 h、48 h 较假手术组均明显升高(*P*<0.01);UK-H 组、UK-L 组血清 NSE 水平在复苏后 6 h 与 PCAS

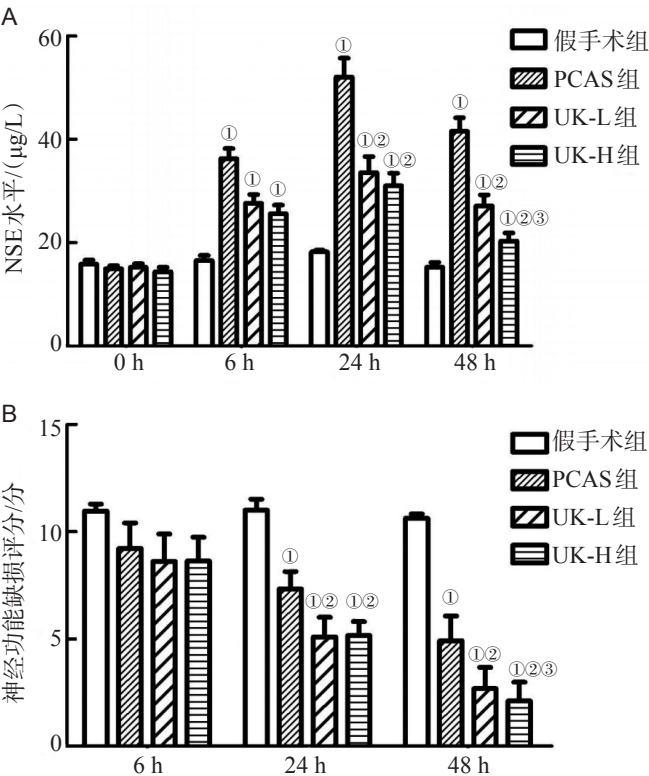
表 1 各组兔基本生理学质量、手术操作时间、各时间点存活情况

组别	只数	体质量/(kg, $\bar{x}\pm s$)	手术操作时间(min, $\bar{x}\pm s$)	ROSC 存活情况/只		
				6 h	24 h	48 h
假手术组	6	2.31±0.18	15±3	6	6	6
PCAS 组	12	2.35±0.21	85±12	11	9	6
UK-L 组	12	2.29±0.17	83±9	11	10	8
UK-H 组	12	2.32±0.18	87±11	10	9	8

组比较差异无统计学意义($P>0.05$),在复苏后24 h、48 h低于PCAS组($P<0.05$);UK-H组血清NSE水平在复苏后6 h、24 h与UK-L组比较差异无统计学意义($P>0.05$),在复苏后48 h低于UK-L组($P<0.05$),见图1A。

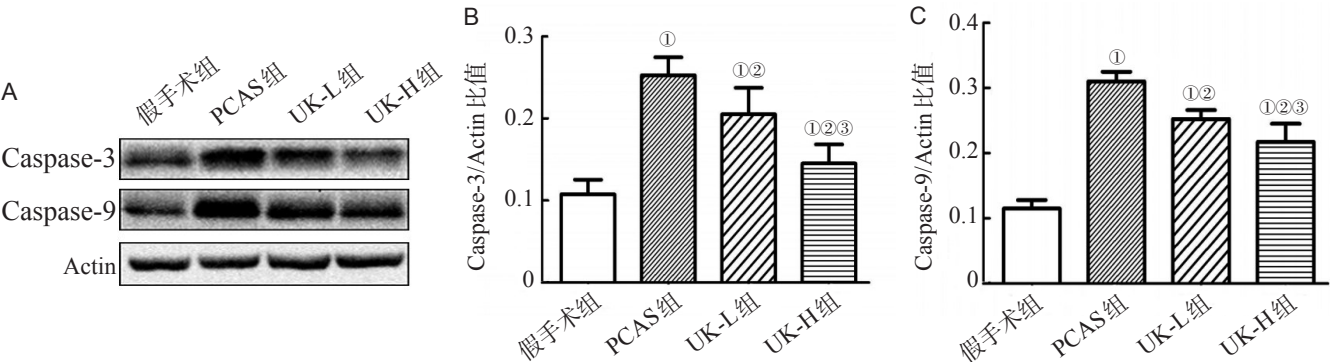
2.3 各组神经损伤功能评分比较

假手术组各时间点神经功能评分无变化;与假手术组比较,PCAS组、UK-H组、UK-L组神经功能损伤评分在复苏后6 h、24 h、48 h逐渐降低($P<0.05$);UK-H组、UK-L组在复苏后24 h、48 h与PCAS组比评分降低显著($P<0.05$);UK-H组在复苏后48 h较UK-L组降低更为明显($P<0.05$),见图1B。



注:A:各组血清NSE水平比较;与假手术组比较,^① $P<0.01$;与PCAS组比较,^② $P<0.05$;与UK-L组比较,^③ $P<0.05$ 。B:各组神经功能评分比较;与假手术组比较,^① $P<0.05$;与PCAS组比较,^② $P<0.05$;与UK-L组比较,^③ $P<0.05$

图1 各组兔血清NSE及神经功能评分比较



注:与假手术组比较,^① $P<0.05$;与PCAS组比较,^② $P<0.05$;与UK-L组比较,^③ $P<0.05$

图2 各组Caspase-3、Caspase-9表达比较

2.4 各组Caspase-3、Caspase-9表达比较

PCAS组、UK-H组、UK-L组的Caspase-3、Caspase-9表达较假手术组增加,UK-H组、UK-L组的Caspase-3、Caspase-9与PCAS组相比表达降低($P<0.05$),且UK-H组较UK-L组明显($P<0.05$),见图2。

3 讨论

PCAS实质是由全身多器官的缺血再灌注损伤引起的多器官功能障碍,神经功能障碍恢复的程度很大程度上决定患者的预后^[9]。脑缺血再灌注后会启动一系列的细胞及代谢损伤机制,包括氧自由基增多引起的氧化应激反应、 Ca^{2+} 超载、炎症因子大量释放、促凋亡因子Caspase-3、Caspase-9等过表达,凋亡抑制因子如BCL-2表达减少等,造成神经功能损伤和缺失^[10,11]。

注射用UK是一种从人的尿液中提取的人组织型激肽原酶,能将激肽原转化为激肽和血管缓激肽,其中血管舒张素与内皮细胞上的B2受体特异性结合,激活脑组织内的eNOS释放血管内皮舒张因子NO,扩张脑血管,改善脑血流,促进神经功能恢复^[12,13]。其机制可能与通过激活细胞间信号调节的激肽酶1/2(ERK1/2)级联反应(尤其是ERK1)及核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB),上调脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)从而减少谷氨酸盐诱导的神经毒性,减少Caspase-3过表达有关^[14,15]。

NSE主要存在于大脑神经元和神经内分泌细胞内,心搏骤停/心肺复苏后NSE可从缺血损伤的神经元中“漏出”并透过血脑屏障进入血液循环,因而血清中NSE水平可反映心搏骤停后脑损伤的严重程度^[16]。本研究发现,PCAS组及UK干预各组血清NSE水平在ROSC后6 h后升高,24 h后达峰,48 h后逐渐减低,变化趋势可能与复苏后脑损伤通常在12~24 h左右达到高峰有关。本研究中,干预组的NSE水平较模型组明显减低,说明UK能够减轻心肺复苏后脑损伤,推测其

对全脑缺血有保护作用。

Caspase-3、9属于半胱氨酸蛋白酶家族成员,直接参与并执行凋亡程序^[17]。缺血性脑损伤时,细胞内外各死亡信号诱导细胞色素C(cytochrome C, cyt-c), cyt-c和Apaf-1结合,形成“凋亡体”,激活Caspase-9,活化的Caspase-9进一步激活Caspase-3,引起细胞凋亡^[18,19],神经保护剂可抑制其表达^[20,21]。本研究发现,ROSC 48 h后UK干预组的Caspase-3、Caspase-9表达水平明显降低,与既往研究结果一致,推测其机制可能与抑制凋亡有关。

本研究同时观测到,与UK-L组比,UK-H组ROSC后48 h的血清NSE水平、神经功能损伤、Caspase-3、Caspase-9水平降低更为明显,说明UK对于全脑缺血的保护作用存在剂量依赖性。上述指标ROSC后6 h、24 h无显著差异,可能与UK浓度通常在24 h后达到峰值有关^[22]。

总之,UK能减少复苏后脑NSE表达,改善神经功能,其机制可能与抑制Caspase-3、Caspase-9表达有关。心肺复苏后脑损伤涉及凋亡机制复杂,本研究并未涉及超微结构如脑线粒体损伤及其凋亡通路机制研究,这将是下一步研究的方向。

参考文献

[1] Mongardon N, Bouglé A, Geri G, et al. [Pathophysiology and management of post-cardiac arrest syndrome][J]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 2013, 32: 779-786.
[2] Kida K, Ichinose F. Preventing ischemic brain injury after sudden cardiac arrest using NO inhalation[J]. *Crit Care*, 2014, 18: 212.
[3] Nitta M, Kitamura T, Iwami T, et al. Out-of-Hospital Cardiac Arrest due to Drowning among Children and Adults from the Utstein Osaka Project[J]. *Resuscitation*, 2013, 84: 1568-1573.
[4] Chao J, Bledsoe G, Chao L. Tissue kallikrein-kinin therapy in hypertension and organ damage[J]. *Prog Drug Res*, 2014, 69: 37-57.
[5] Dobrovojević M, Špiranec K, Sindić A. Involvement of bradykinin in brain edema development after ischemic stroke[J]. *Pflugers Arch*. 2015, 467: 201-212.
[6] 杨敬宁, 肖敏, 王学军, 等. 蛋白酶激活受体-1拮抗剂对兔心脏骤停

后综合征中肾损伤的保护作用及机制[J]. *国际心血管病杂志*, 2014: 402-405.
[7] 李昌盛, 闵喆, 湛彦强, 等. 利用激光散斑成像技术观察尤瑞克林对脑梗死大鼠脑血流的影响[J]. *中华神经科杂志*, 2010, 43: 732-736.
[8] Purdy PD, Sr DM, Batjer HH, et al. Microfibrillar collagen model of canine cerebral infarction[J]. *Stroke*, 1989, 20: 1361-1367.
[9] Mani R, Schmitt SE, Mazer M, et al. The frequency and timing of epileptiform activity on continuous electroencephalogram in comatose post-cardiac arrest syndrome patients treated with therapeutic hypothermia[J]. *Resuscitation*, 2012, 83: 840-847.
[10] Bonova P, Danielisova V, Nemethova M, et al. Scheme of Ischaemia-triggered Agents during Brain Infarct Evolution in a Rat Model of Permanent Focal Ischaemia[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 57: 73-82.
[11] Zhang H, Li H, Liu X, et al. Effect of caspase-9 inhibition on endoplasmic reticulum stress induced cortical neuronal injury in rats[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2013, 6: 546-551.
[12] Chao J, Chao L. Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease[J]. *Exp Physiol*, 2005, 90: 291-298.
[13] 陆征宇, 崔梅, 刘艳萍, 等. 脑缺血后激肽释放酶-激肽系统神经血管保护机制的研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*, 2015, 10: 326-328.
[14] Wang Z, Han X, Cui M, et al. Tissue kallikrein protects rat hippocampal CA1 neurons against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury through the B2R-Raf-MEK1/2-ERK1/2 pathway[J]. *J Neurosci Res*. 2014, 92: 651-657.
[15] Liu Y, Lu Z, Cui M, et al. Tissue kallikrein protects SH-SY5Y neuronal cells against oxygen and glucose deprivation - induced injury through bradykinin B2 receptor - dependent regulation of autophagy induction[J]. *J Neurochem*, 2016, 139: 208-220.
[16] Liu G, Song J, Guo Y, et al. Astragalus injection protects cerebral ischemic injury by inhibiting neuronal apoptosis and the expression of JNK3 after cerebral ischemia reperfusion in rats[J]. *Behav Brain Funct*, 2013, 9: 36-43.
[17] Liu G, Wang T, Wang T, et al. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats[J]. *Biomed Rep*, 2013, 1: 861-867.
[18] Bakhshi J, Weinstein L, Poksay KS, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in mouse melanoma cells: effect of curcumin[J]. *Apoptosis*, 2008, 13: 904-914.
[19] Tran P, Ho SM, Kim BG, et al. TGF- α -activated Kinase 1 (TAK1) and Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1) Interact with the Promyogenic Receptor Cdo to Promote Myogenic Differentiation via Activation of p38MAPK Pathway[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 11602-11615.
[20] Liu Y, Cui M, Lu Z, et al. Tissue kallikrein promotes survival and β -catenin degradation in SH-SY5Y cells under nutrient stress conditions via autophagy[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13: 1389-1394.
[21] Daneman R. The blood - brain barrier in health and disease[J]. *Ann Neurol*, 2012, 72: 648-672.
[22] Wagner S, Kalb P, Lukosava M, et al. Activation of the tissue kallikrein - kinin system in stroke[J]. *J Neurol Sci*, 2002, 202: 75-76.

(本文编辑:王晶)