

利多卡因对兔蛛网膜下腔出血后早期 脑损伤的保护机制研究*

丁浩¹, 符永健², 郑丽蓉¹, 陈金¹, 施贤清^{2△}

1. 贵州医科大学临床医学院 重症医学教研室(贵阳 550004); 2. 贵州省人民医院 ICU(贵阳 550002)

【摘要】 目的 探讨利多卡因对兔蛛网膜下腔出血(SAH)后早期脑损伤的保护机制。方法 18只新西兰大白兔随机分为3组:假手术(Sham)组、蛛网膜下腔出血(SAH)组、利多卡因(LD)组。各组动物均在麻醉下行手术操作,SAH组和LD组动物取自体动脉血1 mL/kg(按体质量计)注入枕大池,Sham组注入等量生理盐水;30 min后LD组兔经静脉注入20 mg/mL利多卡因0.6 mL,SAH组、Sham组注入等量生理盐水。72 h后进行摄食量和神经功能损害分级,采用实时荧光定量PCR(RT-PCR)及Western blot技术检测兔脑海马组织中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)、细胞色素C(Cyt-c)mRNA及蛋白的表达。结果 与Sham组比较,SAH、LD组兔摄食量减少,出现不同程度的神经功能损害,脑海马组织中Caspase-3、Cyt-c mRNA及蛋白表达增加($P < 0.05$);与SAH组比较,LD组兔摄食量及神经功能损害差异无统计学意义($P > 0.05$),脑海马组织中Caspase-3、Cyt-c mRNA及蛋白表达减少($P < 0.05$)。结论 利多卡因对兔SAH后早期脑损伤的保护机制可能与下调脑组织Caspase-3、Cyt-c mRNA及蛋白表达,抑制线粒体通路有关。

【关键词】 利多卡因 蛛网膜下腔出血 早期脑损伤 线粒体通路

Neuroprotection Mechanism of Lidocaine in Rabbits with Early Brain Injury Resulted from Subarachnoid Hemorrhage

DING Hao¹, FU Yong-jian², ZHENG Li-rong¹, CHEN Jin¹, SHI Xian-qing^{2△}. 1. Department of ICU, School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Department of ICU, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China

△ Corresponding author, E-mail: shixianqing@126.com

【Abstract】 **Objective** To determine the neuroprotection mechanism of lidocaine on early brain injury resulted from subarachnoid hemorrhage. **Methods** Eighteen New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: Sham group, subarachnoid hemorrhage (SAH) group and lidocaine treatment (LD) group. Operations were performed on all animals under anesthesia. Autologous nonheparinized arterial blood (1 mL/kg, body mass) was injected into cisterna magna of rabbits in the SAH and LD groups, while saline (1 mL/kg, body mass) was given to rabbits in the sham group. Thirty minutes later, intravenous injection of 0.6 mL 20 mg/mL lidocaine was given to those in the LD group, and intravenous injection of 0.6 mL saline was given to those in the Sham and SAH groups. Food intake and neurological impairments of the rabbits were assessed 72 h after the induction of SAH. The protein and mRNA expressions of Caspase-3 and cytochrome-c (Cyt-c) in hippocampus tissues were detected using real-time PCR (RT-PCR) and Western blot. **Results** Rabbits in the SAH and LD groups had lower food intake and higher mRNA and protein expressions of Caspase-3 and Cyt-c than those in the sham groups, which was accompanied with varying degrees of neurological impairments. No significant differences in food intake and neurological impairments were found between the SAH and LD groups ($P > 0.05$). However, rabbits in the LD group had lower levels of mRNA and protein expressions of Caspase-3 and Cyt-c than those in the SAH group ($P < 0.05$). **Conclusion** The neuroprotection mechanism of lidocaine on early brain injury in rabbits with subarachnoid hemorrhage may be associated with inhibition of mitochondrial pathway and downregulated mRNA and protein expressions of Caspase-3 and Cyt-c in brain tissues.

【Key words】 Lidocaine Subarachnoid hemorrhage Early brain injury Mitochondrial pathway

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是临床常见的急性脑血管疾病,致残率及死

亡率较高^[1],近年越来越多的研究显示,早期脑损伤(early brain injury, EBI)可能是导致SAH患者死亡风险较高和决定预后的首要原因^[2],早期脑损伤是指SAH后72 h内整个脑组织发生的直接损伤,包括颅内压增高、全脑血流量减少、血脑屏障破坏、

* 贵州省科学技术基金项目(黔科合基础[2016]1095号)资助

△ 通信作者, E-mail: shixianqing@126.com

微循环功能障碍和细胞凋亡等^[3], 而细胞凋亡在 SAH 后早期脑损伤的病理进程中发挥着重要的作用^[4-5]。利多卡因作为一种局部麻醉药及抗心律失常药, 已证实对 SAH 具有脑保护作用^[6], 但具体机制尚不清楚。因此, 本研究通过检测凋亡相关指标半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)、细胞色素 (Cyt-c) 的表达, 探讨利多卡因对 SAH 后早期脑损伤的保护机制。

1 对象和方法

1.1 动物及分组

18 只新西兰大白兔, 遵义医学院动物实验中心提供, 雌雄不拘, 体质量 2.0~2.5 kg。随机分为 3 组, 每组 6 只, 分别为假手术 (Sham) 组、蛛网膜下腔出血 (SAH) 组、利多卡因 (LD) 组。实验操作、动物饲养及管理按相关规定进行。

1.2 SAH 模型制作

参照 ZHOU 等^[7]的方法制作兔 SAH 模型, 兔称重后进行静脉穿刺置管, 3% 戊巴比妥钠 (1 mL/kg) 麻醉后予面罩给氧, 枕部剃毛消毒后, 触及枕骨下间隙 (枕大池), 予 5 号针刺入, 有突破感后见脑脊液流出, 取兔耳中动脉非抗凝血 1 mL/kg (按体质量计) 缓慢注入, Sham 组注入 1 mL/kg 生理盐水 (按体质量计), 完毕后取 30° 头低位 30 min, 然后侧卧位, LD 组经静脉缓慢注入 20 mg/mL 利多卡因 0.6 mL, SAH 组、Sham 组注入等量生理盐水, 动物苏醒后送回动物饲养室喂养。

1.3 神经生物学分级

参照 ENDO 等^[8] 4 级分级标准, 在兔 SAH 后 72 h 进行摄食量和神经功能损害分级。摄食量分级: 1 级为 100%, 2 级为 >50% 且 <100%, 3 级为 <50% 且 >0%, 4 级为 0%; 神经功能损害分级: 1 级为正常 (无神经功能障碍), 2 级为轻度或可疑神经功能障碍 (嗜睡、活动减少), 3 级为中度神经功能障碍 (肢体无力、跛行), 4 级为重度神经功能障碍 (划圈运动或行走困难)。

1.4 分离兔脑海马组织

各组动物在 SAH 后 72 h, 麻醉后迅速断头取出脑组织, 将其放入培养皿中予 4 °C 预冷的 PBS 液快速冲洗 3 次, 将培养皿置于冰上操作, 沿中线将大脑分开, 固定脑前端, 轻轻剥离脑尾端皮层, 暴露并取出海马, 迅速提取海马组织总 RNA 及蛋白。

1.5 RT-PCR 检测 Caspase-3、Cyt-c mRNA 的表达

用 Trizol 试剂提取兔海马组织总 RNA, 进行浓度及纯度测定, 合格后将 RNA 逆转录为 cDNA, 根据逆转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书配制 20 μ L 反应总体系, 反应条件 37 °C 15 min, 85 °C 5 s; 然后进行实时荧光定量 PCR, 配制 25 μ L 反应总体系, Caspase-3 与 Cyt-c 反应条件同样, 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s 共 40 个循环, 引物设计及合成由上海生工生物有限公司完成 (表 1), 以 GAPDH 为内参; 反应结束后, 读取各样本的 Ct 值, 应用国际通用的相对定量法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法) 计算目的基因的相对表达量。

表 1 基因引物序列

Table 1 Gene primer sequences

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Primer length
Caspase-3	TGCCATGCTGAAAGAGTACG	GCATCAAGGGAATAGGACTCG	102 bp
Cyt-c	GCCCGTATCAGCCCTACTTC	GTCGTTTTGTGTGAGGGCAC	169 bp
GAPDH	TGCCACCCACTCCTCTACCTTCG	CCGGTGGTTTGAGGGCTCTTACT	163 bp

1.6 Western blot 检测 Caspase-3、Cyt-c 蛋白表达

用 RIPA 裂解液、线粒体分离试剂盒分别提取兔海马组织全细胞蛋白 (用于 Caspase-3 检测) 及胞浆蛋白 (用于 Cyt-c 检测), 进行蛋白浓度测定, 电泳分离蛋白, 将其转移到 PVDF 膜后封闭 1 h, 用 TBST 液根据不同抗体的稀释比例 [Caspase-3 为 1:500、Cyt-c 为 1:1000 (Abcam 公司), β -actin 为 1:500 (武汉博士德公司)] 稀释一抗, 将膜放入密封袋中, 加入稀释好的一抗, 4 °C 过夜, 次日按同样的方法稀释二抗 (北京中杉金桥公司), 室温下轻摇孵育 1 h, 用凝胶成像分析系统检测条带, Image J 软

件测出目的条带的灰度值, 并与内参条带的灰度值比较, 计算目的蛋白的相对表达量。

1.7 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组总体均数比较采用单因素方差分析, 计数资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经生物学分级

由表 2 可见, SAH 后 72 h 兔摄食量及神经功能损害结果显示, 与 Sham 组比较, SAH、LD 组兔

摄食量减少,出现不同程度的神经功能损害($P < 0.05$);与 SAH 组比较,LD 组摄食量及神经功能损害差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 SAH 后 72 h 摄食量及神经功能损害分级/例数

Table 2 Food intake and neurological impairments 72 h after induction of SAH/case

Group	Food intake/grade				Neurological impairment/grade			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Sham	6	0	0	0	6	0	0	0
SAH	0	0	5	1	0	1	3	2
LD	0	1	5	0	0	4	2	0

2.2 各组兔海马组织 Caspase-3、Cyt-c mRNA 的表达

与 Sham 组比较,SAH、LD 组兔海马组织 Caspase-3、Cyt-c mRNA 相对表达量增加($P < 0.05$);与 SAH 组比较,LD 组兔海马组织 Caspase-3、Cyt-c mRNA 相对表达量减少($P < 0.05$),见图 1。

2.3 各组兔海马组织 Caspase-3、Cyt-c 蛋白的表达

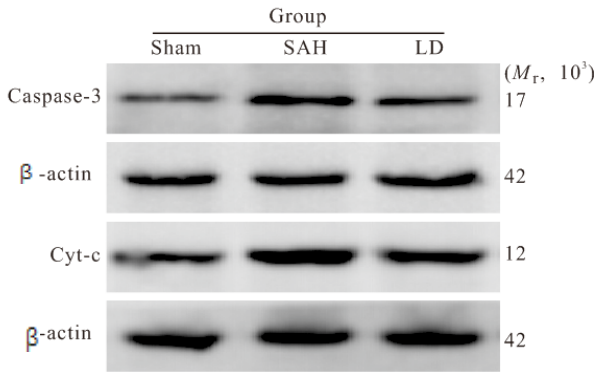


图 2 Western blot 检测各组兔海马组织中 Caspase-3、Cyt-c 蛋白的表达

Fig 2 Protein expressions of Caspase-3 and Cyt-c in hippocampus tissues

a: $P < 0.05$, vs. Sham group; b: $P < 0.05$, vs. SAH group

3 讨论

细胞凋亡在 SAH 后早期脑损伤的病理进程中发挥着重要的作用^[4],目前认为,参与细胞凋亡的通路主要有 3 条,即线粒体通路、死亡受体通路及内质网通路^[9],线粒体通路可能是引起 SAH 后早期脑损伤细胞凋亡的主要方式^[10]。因此,本研究主要通过检测线粒体通路相关指标 Caspase-3、Cyt-c 的表达来探讨利多卡因对 SAH 后早期脑损伤的保护机制。

Caspase-3 是多种凋亡通路的共同作用点,是凋亡下游的关键执行者,活化的 Caspase-3 是凋亡发生的有力证据;Cyt-c 是凋亡过程中的重要调控蛋白,通常认为,在线粒体介导的凋亡通路中,Cyt-c

与 Sham 组比较,SAH、LD 组兔海马组织 Caspase-3、Cyt-c 蛋白相对表达量增加($P < 0.05$);与 SAH 组比较,LD 组兔海马组织 Caspase-3、Cyt-c 蛋白相对表达量减少($P < 0.05$),见图 2。

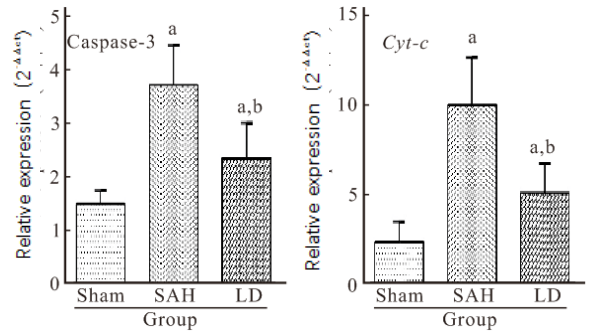
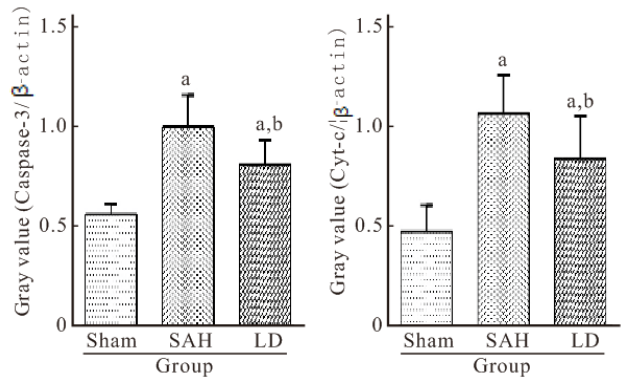


图 1 各组兔海马组织中 Caspase-3、Cyt-c mRNA 相对表达量

Fig 1 mRNA expressions of Caspase-3 and Cyt-c in hippocampus tissues

a: $P < 0.05$, vs. Sham group; b: $P < 0.05$, vs. SAH group



的释放是关键性步骤。线粒体通路主要由 Bcl-2 家族介导,依赖于 Cyt-c 从线粒体膜转位至胞浆中,与凋亡活化因子 1(Apaf-1)结合,继而启动 Caspase 级联反应,激活下游的 Caspase-3,最终导致细胞凋亡^[11]。本研究结果显示,SAH 组兔海马组织 Caspase-3、Cyt-c mRNA 表达增加,同时通过 Western blot 也检测到 Caspase-3、Cyt-c 蛋白表达增加,可见线粒体通路介导了 SAH 后早期脑损伤细胞凋亡的发生,此结果与文献报道一致^[10];LD 组兔海马组织 Caspase-3、Cyt-c mRNA 表达较 SAH 组减少,而 Caspase-3、Cyt-c 蛋白也出现相应的变化,说明利多卡因具有脑保护作用,这与 SHI 等^[6]研究结果一致,而本研究结果则进一步说明利多卡因一方面可以通过转录水平对调控细胞凋亡的基因

进行抑制,另一方面也可以通过抑制 Caspase-3 的活化及 Cyt-c 的释放减少细胞凋亡的发生,这可能是利多卡因发挥脑保护作用的机制。

本研究在观察动物摄食量及神经功能损害时发现,与 Sham 组比较,SAH 组、LD 组兔摄食量减少,出现不同程度的神经功能损害,这可能与出血后脑组织损伤、兔摄食中枢受到抑制有关;然而,LD 组与 SAH 组比较,无论是摄食量还是神经功能损害差异均无统计学意义,这可能与组间样本量相对较少、利多卡因用量不足有关,尚需加大样本量及利多卡因用量进一步研究。

总之,本研究表明利多卡因对兔 SAH 后早期脑损伤的保护机制可能与下调 Caspase-3、Cyt-c mRNA 及蛋白表达,抑制线粒体通路有关,这为临床治疗 SAH 提供了实验依据,但其保护机制是否存在其它凋亡通路参与,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] DONG Y, FAN C, HU W, *et al.* Melatonin attenuated early brain injury induced by subarachnoid hemorrhage via regulating NLRP3 inflammasome and apoptosis signaling. *J Pineal Res*, 2016, 60(3):253-262.
- [2] YAN H, ZHANG D, HAO S, *et al.* Role of mitochondrial calcium uniporter in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(3):1637-1647.
- [3] CHEN S, FENG H, SHERCHAN P, *et al.* Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage. *Prog Neurobiol*, 2014, 115(2):64-91.
- [4] SHAO A, WANG Z, WU H, *et al.* Enhancement of

autophagy by histone deacetylase inhibitor trichostatin A ameliorates neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(1):18-27.

- [5] SERRONE JC, MAEKAWA H, TJAHJADI M, *et al.* Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: pathobiology, current treatment and future directions. *Expert Rev Neurother*, 2015, 15(4):367-380.
- [6] SHI XQ, YE BN, HU YD, *et al.* Inhibitory effects of lidocaine on cerebral vasospasm in rabbit model of subarachnoid hemorrhage. *Neur Regen Res*, 2010, 5(21):1657-1662.
- [7] ZHOU ML, SHI JX, ZHU JQ, *et al.* Comparison between one- and two-hemorrhage models of cerebral vasospasm in rabbits. *J Neurosci Methods*, 2007, 159(2):318-332.
- [8] ENDO S, BRANSON PJ, ALKSNE JF. Experimental model of symptomatic Vasospasm rabbits. *Stroke*, 1988, 19(11):1420-1425.
- [9] LIU Q, ZHAO D, JI YX, *et al.* Role of Glucose-regulated Protein 78 in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2016, 36(2):168-173.
- [10] HASEGAWA Y, SUZUKI H, SOZEN T, *et al.* Apoptotic mechanisms for neuronal cells in early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 110(Pt1):43-48.
- [11] MORALES-CRUZ M, FIGUEROA CM, GONZ LEZ-ROBLES T, *et al.* Activation of caspase-dependent apoptosis by intracellular delivery of Cytochrome c-based nanoparticles. *J Nanobiotechnol*, 2014 (12): 33 [2016-05-17]. <http://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-014-0033-9>. doi: 10.1186/s12951-014-0033-9.

(2016-09-22 收稿, 2016-12-09 修回)

编辑 沈进