

. 实验研究 .

上胸段硬膜外应用罗哌卡因纳米微粒对兔迟发型脑血管痉挛的作用

苏长生 王丽萍 陈国忠 杨建藤 林文谦

【摘要】目的 探讨上胸段硬膜外应用罗哌卡因纳米微粒对兔蛛网膜下腔出血(SAH)后迟发型脑血管痉挛(DCVS)的影响。**方法** 将上胸段硬膜外置管成功的新西兰兔75只随机均分为5组($n=15$):假手术组、SAH组、纳米粒空载体组、纳米粒载药组和泵注药物组;各组再分为造模后1、7、14 d三个亚组($n=5$)。采用枕大池二次注血法制作SAH模型,二次注血后30 min,纳米粒空载体组经硬膜外导管注射等体积纳米微粒空载体,纳米粒载药组注射罗哌卡因纳米微粒(60 mg/kg;含罗哌卡因8 mg/kg),泵注药物组经硬膜外导管接镇痛泵持续泵入0.1%罗哌卡因(1 ml/h)。采用Yamaguchi评分评估神经功能,采用经颅多普勒超声检测基底动脉平均血流速度(V_m)和收缩期峰值血流速度(V_p),ELISA法检测血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)、S100B水平,HE染色光镜下观察基底动脉(BA)形态并测量其管径,免疫组化染色观察BA内皮细胞内皮型一氧化氮合酶(eNOS)与内皮素(ET-1)表达。**结果** 造模后1、7、14 d,与假手术组相比,SAH组兔神经功能评分均明显增高($P<0.05$),BA V_m 和 V_p 均明显增高($P<0.05$),血清NSE和S100B水平均明显增高($P<0.05$),BA管径均明显缩小($P<0.05$),BA内皮细胞eNOS表达水平明显降低($P<0.05$),BA内皮细胞ET-1表达水平明显增高($P<0.05$);SAH组与纳米粒空载体组上述指标均无明显差异($P>0.05$);与SAH组相比,泵注药物组 V_m 和 V_p 显著降低($P<0.05$),神经功能显著改善($P<0.05$),血清NSE和S100B水平和BA内皮细胞ET-1表达水平显著降低($P<0.05$),BA内皮细胞eNOS表达水平显著增高($P<0.05$);纳米粒载药组与泵注药物组无明显差异($P>0.05$)。**结论** 上胸段硬膜外泵注罗哌卡因能改善兔SAH后DCVS,而硬膜外应用罗哌卡因纳米微粒能够获得同样的效果。

【关键词】 蛛网膜下腔出血;迟发型脑血管痉挛;上胸段硬膜外腔阻滞;罗哌卡因;纳米药物;兔

【文章编号】 1009-153X(2016)09-0540-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.9

Effect of ropivacaine discharged from nanoparticles in upper thoracic epidural space on delayed cerebral vasospasm in rabbits with SAH

SU Chang-sheng, WANG Li-ping, CHEN Guo-zhong, YANG Jian-teng, LIN Wen-qian. Department of Anesthesiology, Fuzhou General Hospital, Nanjing Command, PLA, Fuzhou 350025, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of ropivacaine discharged from nanoparticles in the upper thoracic epidural on delayed cerebral vasospasm (DCVS) in rabbits after subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** The upper thoracic epidural catheter were successfully placed in 75 healthy New Zealand rabbits which were randomly divided into five groups of 15 rabbits each, i.e. sham-operation group, control group, placebo nanoparticles group, ropivacaine-loaded nanoparticles group and pumping ropivacaine group. The models of SAH were established by two injections of autoblood into the cistern magnas. Neurobehavioral score was determined after SAH. Transcranial Doppler ultrasonography was used to detect the basilar artery (BA) mean flow velocity (V_m) and peak systolic blood flow velocity (V_p). The serum levels of neuron specific enolase (NSE) and S100B protein were measured by ELISA method. Morphological changes were observed under light microscope and tube diameters of BA were measured. The expressions of endothelin-1 (ET-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were measured by immunohistochemical technique in the endothelial cells of BA. **Results** The neurobehavioral score, degree of BA stenosis, V_m and V_p , level of ET-1 expression in the endothelial cells of BA and serum levels of NSE and S100B protein were significantly lower and the level of eNOS expression was significantly higher in ropivacaine-loaded nanoparticles group than placebo nanoparticles and control groups ($P<0.01$). **Conclusion** DCVS after SAH can be alleviated by ropivacaine discharged from nanoparticles in upper thoracic epidural space in the rabbits.

【Key words】 Subarachnoid hemorrhage; Delayed cerebral vasospasm; Upper thoracic epidural space; Ropivacaine; Nanoparticles

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.09.010

基金项目:福建省科技计划资助项目(2012Y0054)

作者单位:350025 福州,南京军区福州总医院麻醉科(苏长生、王丽萍、陈国忠、杨建藤、林文谦)

通讯作者:陈国忠, E-mail: cgzsq2000@sina.com

迟发型脑血管痉挛(delayed cerebral vasospasm, DCVS)是导致蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)残疾、死亡的主要原因之一^[1]。中枢交感神经持续兴奋是促发DCVS因素之一,交感神经阻滞能减轻SAH后CVS^[2,3]。SAH后各种损伤因

子会造成血管舒缩稳定的失衡。我们之前研究发现连续上胸段硬膜外应用罗哌卡因,可通过阻滞交感神经,下调脑血管内皮细胞内皮素-1(endothelin-1, ET-1)的表达,上调内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的表达,从而改善 SAH 后 CVS^[4]。长时间留置硬膜外导管易引起一系列不良反应。纳米粒载药系统具有缓释、提高药物的组织滞留时间、增加药物疗效及降低毒副作用等优点^[5]。本研究探讨兔上胸段硬膜外应用罗哌卡因纳米微粒对兔 SAH 后 DCVS 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康新西兰大白兔,由南京军区福州总医院比较医学科提供,雌雄不定,体重 2.1~3.2 kg,兔龄 6~7 个月。

1.2 试剂与仪器 氯胺酮(批号:H32022820)为江苏恒瑞医药股份公司产品,盐酸罗哌卡因(批号:110502)为恒瑞医药有限公司产品,罗哌卡因纳米微粒(批号:20140827)为南京军区福州总医院药学科自制;兔神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)和 S100B 试剂盒购自 Andy Gene 公司, eNOS 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, ET-1 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;硬膜外导管为南京宁创医疗设备公司产品,镇痛泵(100 ml, 1 ml/h)为扬州邗江双菱医疗器械公司产品,监护仪为美国 Spacelabs Medical 公司产品,经颅多普勒超声仪(TC2021)为 Nicolet 公司产品,光学显微镜为日本 Olympus CX41。

1.3 模型制作 ①腹腔注射氯胺酮(35 mg/kg)麻醉后,耳背中央动脉置管监测动脉压(arterial blood pressure, ABP)和心率,参照陈志扬等^[6]介绍的方法行上胸段硬膜外置管,使导管达胸₂₋₄椎管水平,抽吸感负压未见脑脊液及血后并给予 0.1%罗哌卡因 1 ml 作为试验剂量,观察 ABP 变化,阻滞有效则平均动脉压下降,可确认在硬膜外腔,固定导管并抗感染处理后放回笼子,连续观察 3 d 无神经损伤与感染且饮食正常者可说明硬膜外置管成功。②采用枕大池二次注血法制作 SAH 模型^[5]。

1.4 分组和给药 硬膜外置管成功的新西兰兔 75 只,按随机数字表法随机分为 5 组(n=15):假手术组、SAH 组、纳米粒空载体组、纳米粒载药组和泵注药物组。假手术组枕大池注入等量生理盐水,其余 4 组注入自体血。各组再分为造模后 1、7、14 d 三个亚组(n=5)。二次注血后 30 min,纳米粒空载体组经硬膜

外导管注射等体积纳米微粒空载体,纳米粒载药组注射罗哌卡因纳米微粒(60 mg/kg;含罗哌卡因 8 mg/kg);泵注药物组硬膜外导管接镇痛泵持续泵入 0.1%罗哌卡因(1 ml/h)。

1.5 行为活动观察 根据 Yamaguchi 评分观察并评价 SAH 后各组兔在造模后 1、7、14 d 的行为和活动情况^[7],主要从进食,活动度和神经缺陷三个方面来评价,采用双盲法评价,得分越高,则行为及活动越差。

1.6 基底动脉(basilar artery, BA)血流测定 造模前和造模后 1、7、14 d,用 2 MHz 的探头经颅多普勒超声(transcranial Doppler, TCD),从兔枕窗探测 BA 血流信号,深度为 43~52 mm,记录其平均血流速度(mean flow velocity, V_m)与收缩期峰值血流速度(peak systolic velocity, V_p)两个参数。

1.7 血清 NSE 和 S100B 测定 造模前和造模后 1、7、14 d,经兔耳中动脉采集动脉血 2 ml,静置 2 h 后,3 500 转/min 离心 15 min,留取上清液,-80℃保存待测。严格按照 ELISA 试剂盒要求测定血 NSE 和 S100B 蛋白浓度。

1.8 光镜下观察 BA 形态 TCD 检查和抽取动脉血后,相应时间点麻醉处死,快速剪开颅骨取出完整的脑组织,先行大体标本观察,再剪取 BA,常规石蜡切片,HE 染色,光镜下观察各组 BA 形态学变化并在 40 倍视野下用 Imagepro-plus 6.0 图像分析软件计算管腔直径(μm)。

1.9 BA 内皮细胞 ET-1、eNOS 表达检测 取各组包埋好的 BA 常规石蜡切片,免疫组化法检测 BA 血管内皮细胞层 ET-1(一抗浓度 1:1 000)、eNOS(一抗浓度 1:500)表达,阳性表达区呈棕色或者棕黄色着色,每片随机选取 5 个高倍($\times 400$)视野,应用 Imagepro-plus 6.0 图像分析软件计算每个视野中血管内皮细胞层阳性区域的累积光密度值。

1.10 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为活动观察评分结果变化 造模后 1、7、14 d,兔神经行为评分均明显增高($P < 0.05$);纳米粒空载体组与 SAH 组无明显差异($P > 0.05$);纳米粒载药组和泵注药物组较纳米粒空载体组均明显降低($P < 0.05$),纳米粒载药组和泵注药物组之间无明显差异($P > 0.05$)。详见图 1。

2.2 各组 BA V_m 、 V_p 变化 造模后 1、7、14 d,兔 BA V_m

表1 各组基底动脉V _m 与V _p 比较(cm/s, $\bar{x}\pm s$)					
血流参数	组别	术前	术后1 d	术后7 d	术后14 d
V _m	假手术组	13.08±2.05	15.48±1.61	15.18±1.82	14.80±1.76
	SAH组	15.92±2.30	22.54±1.82 ^{*#}	22.02±2.46 ^{*#}	19.08±0.86 ^{*#}
	纳米粒空载体组	15.20±1.22	22.58±0.62 ^{*#}	24.78±4.01 ^{*#}	19.82±1.83 ^{*#}
	纳米粒载药组	14.08±2.16	18.72±1.49 [*]	16.86±0.90 [*]	15.72±1.77 [*]
	泵注药物组	14.38±2.37	19.14±1.04 [*]	17.22±0.89 [*]	16.08±0.56 [*]
V _p	假手术组	31.82±2.24	33.07±1.96	31.99±1.39	32.64±1.63
	SAH组	31.88±3.11	50.28±3.61 ^{*#}	46.24±3.16 ^{*#}	44.62±3.61 ^{*#}
	纳米粒空载体组	33.98±2.83	51.72±1.79 ^{*#}	50.77±6.04 ^{*#}	45.04±3.02 ^{*#}
	纳米粒载药组	33.96±4.12	38.78±2.29 [*]	36.32±2.24 [*]	33.20±2.08 [*]
	泵注药物组	31.65±2.19	39.26±2.65 [*]	35.18±1.17 [*]	32.66±2.28 [*]

注:与假手术组相应值比,**P*<0.05;与纳米粒载药组相应值比,#*P*<0.05;SAH:蛛网膜下腔出血;V_m:平均血流速度;V_p:收缩期峰值血流速度

和V_p均明显增高(*P*<0.05);纳米粒空载体组与SAH组无明显差异(*P*>0.05);纳米粒载药组和泵注药物组较纳米粒空载体组均明显降低(*P*<0.05),纳米粒载药组和泵注药物组之间无明显差异(*P*>0.05)。详见表1。

2.3 各组血清NSE和S100B水平变化 造模后1、7、14 d,兔血清NSE和S100B水平均明显增高(*P*<0.05);纳米粒空载体组与SAH组无明显差异(*P*>0.05);纳米粒载药组和泵注药物组较纳米粒空载体组均明显降低(*P*<0.05),纳米粒载药组和泵注药物组之间无明显差异(*P*>0.05)。详见图2、3。

2.4 BA组织染色观察 HE染色显示(图4),假手术组BA管腔呈舒张状态、管壁薄,血管内膜完整,内皮细胞未见坏死、脱落,核无固缩、深染。造模后1 d,SAH组与纳米粒空载体组管壁增厚,管腔狭窄,可见少量血管内皮细胞脱落,内皮细胞排列不整齐且肿胀,管壁结构层次较紊乱,偶见核固缩、深染;造模后7 d加重,造模后14 d有所缓解。与较SAH组和纳米粒空载体组比,纳米粒载药组上述变化改善。造模后1、7、14 d,兔BA管径均明显缩小(*P*<0.05);纳米粒空载体组与SAH组无明显差异(*P*>0.05);纳米粒载药组和泵注药物组较纳米粒空载体组均明显增大(*P*<0.05),纳米粒载药组和泵注药物组之间无明显差异(*P*>0.05)。详见图5。

免疫组化染色显示(图4),造模后1、7、14 d,兔BA eNOS表达水平均明显降低(*P*<0.05),ET-1表达水平明显增高(*P*<0.05);纳米粒空载体组eNOS和ET-1表达水平与SAH组无明显差异(*P*>0.05);与纳

米粒空载体组相比,纳米粒载药组和泵注药物组eNOS表达水平均明显增高(*P*<0.05),ET-1表达水平均明显降低(*P*<0.05);纳米粒载药组eNOS和ET-1表达水平和泵注药物组之间均无明显差异(*P*>0.05)。详见图6、7。

3 讨论

DCVS是导致迟发型缺血性神经功能障碍和迟发型脑损伤的重要原因^[8],减轻CVS可以有效预防迟发型脑损伤^[9]。SAH后交感神经兴奋,循环系统中儿茶酚胺增加,易诱发CVS和心血管功能紊乱^[10]。因此,阻滞颈交感神经节或上胸段硬膜外交感节前纤维,能使支配脑血管的副交感神经相对兴奋,缓解CVS。有研究应用利多卡因阻滞上胸段硬膜外交感神经,结果发现其能舒张兔SAH后脑血管,增加脑血流量,改善神经功能紊乱^[3]。本研究发现上胸段硬膜外泵注罗哌卡因显著改善兔SAH后DCVS,改善兔神经功能;而且,硬膜外应用罗哌卡因纳米微粒能达到同样的效果。

CVS易造成周围脑组织供血不足从而引发局部或广泛的脑损伤。SAH后常发生脑细胞破坏和血脑屏障损害,同时会加剧脑血流和脑细胞代谢变化,从而引发中枢神经系统进行性损害,最终导致细胞膜通透性受到破坏。S-100B蛋白是神经胶质细胞的标志蛋白,NSE是神经元的标志酶。有研究认为血清NSE、S100B可以作为SAH后疗效的判断指标^[11]。我们研究结果显示兔SAH后血清NSE和S100B水平均升高;膜外泵注罗哌卡因显著降低血清NSE和

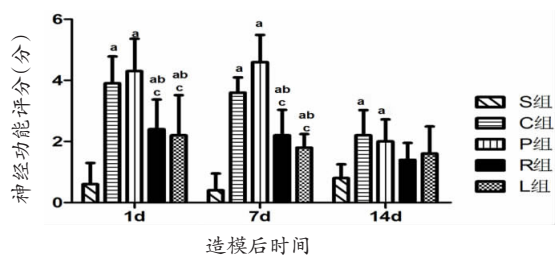


图 1 各组大鼠神经功能评分比较

与 S 组相应值比, a $P<0.05$; 与 P 组相应值比, b $P<0.05$; 与 C 组相应值比, c $P<0.05$; S 组: 假手术组; C 组: SAH 组; P 组: 纳米粒空载体组; R 组: 纳米粒载药组; L 组: 泵注药物组

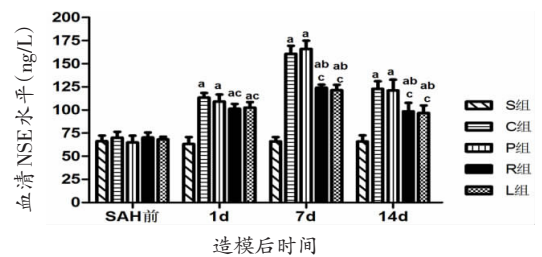


图 2 各组大鼠血清 NSE 水平比较

与 S 组相应值比, a $P<0.05$; 与 P 组相应值比, b $P<0.05$; 与 C 组相应值比, c $P<0.05$; S 组: 假手术组; C 组: SAH 组; P 组: 纳米粒空载体组; R 组: 纳米粒载药组; L 组: 泵注药物组; NSE: 神经元特异性烯醇化酶

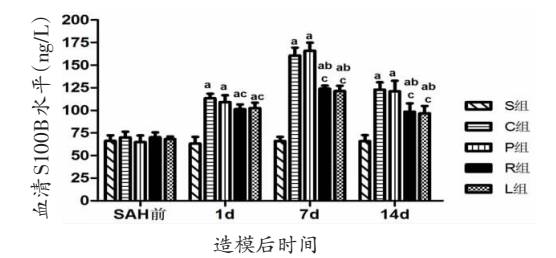


图 3 各组大鼠血清 S100B 水平比较

与 S 组相应值比, a $P<0.05$; 与 P 组相应值比, b $P<0.05$; 与 C 组相应值比, c $P<0.05$; S 组: 假手术组; C 组: SAH 组; P 组: 纳米粒空载体组; R 组: 纳米粒载药组; L 组: 泵注药物组

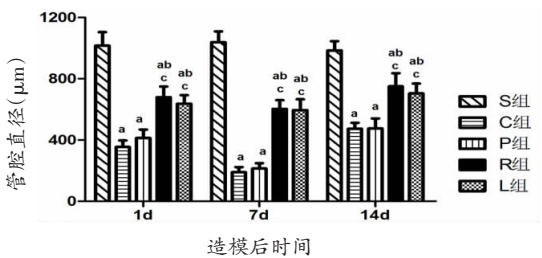


图 5 各组大鼠基底动脉管腔直径比较

与 S 组相应值比, a $P<0.05$; 与 P 组相应值比, b $P<0.05$; 与 C 组相应值比, c $P<0.05$; S 组: 假手术组; C 组: SAH 组; P 组: 纳米粒空载体组; R 组: 纳米粒载药组; L 组: 泵注药物组

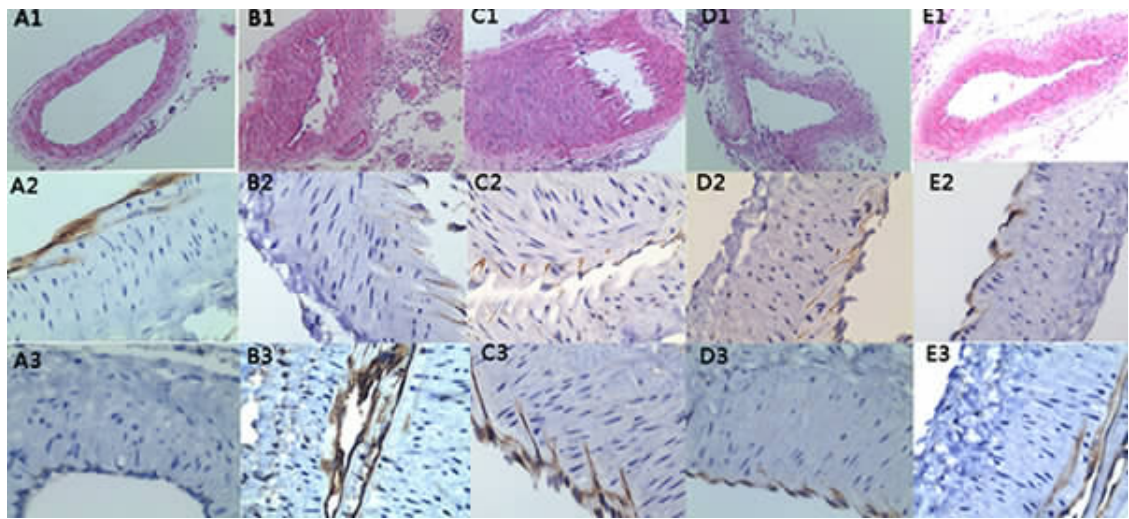


图 4 各组大鼠基底动脉组织染色图

A1、B1、C1、D1、E1 为造模后 7 d 基底动脉 HE 染色 (×100); A2、B2、C2、D2、E2 为造模后 7 d 基底动脉血管内皮细胞内皮型一氧化氮合酶免疫组化染色 (×400); A3、B3、C3、D3、E3 为造模后 7 d 基底动脉血管内皮细胞内皮素-1 免疫组化染色 (×400); A1、A2、A3 为假手术组; B1、B2、B3 为 SAH 组; C1、C2、C3 为纳米粒空载体组; D1、D2、D3 为纳米粒载药组; E1、E2、E3 为泵注药物组

S100B 水平, 而且硬膜外应用罗哌卡因纳米微粒能获得同样效果。

SAH 后缩血管因素相对增多而舒血管因素相对减少是导致 DCVS 的重要原因。ET-1 是一种主要由血管内皮细胞合成并释放的强效缩血管物质, 而一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是由血管内皮细胞 eNOS 合

成并释放的具有强效生物学活性的舒血管物质。SAH 后红细胞裂解产物及其氧合血红蛋白能够刺激血管内皮细胞 ET-1 的表达增强, 同时 NO 的合成或释放功能受损, NO 与 ET-1 的脑血管舒缩平衡被打破, 加剧 CVS 的发生^[12]。发生 DCVS 的血管壁以 ET-1 为代表的缩血管因子表达显著增加而以 NO 为

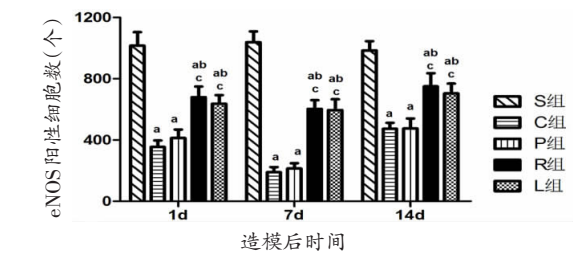


图6 各组大鼠基底动脉血管内皮细胞eNOS表达比较与S组相应值比,a $P<0.05$;与P组相应值比,b $P<0.05$;与C组相应值比,c $P<0.05$;S组:假手术组;C组:SAH组;P组:纳米粒空载体组;R组:纳米粒载药组;L组:泵注药物组;eNOS:内皮型一氧化氮合酶

代表的舒血管因素则明显减少^[4]。有研究应用布比卡因阻滞颈交感神经,发现其能通过增加血清或脑脊液NO含量和NOS活性,改善SAH后CVS^[2]。上胸段硬膜外连续应用罗哌卡因,不仅能增加SAH后BA周围脑组织糖皮质激素受体的表达,抑制肿瘤坏死因子- α 、白介素-1、白介素-6过度分泌^[13];还能引起BA血管内皮细胞ET-1表达下调、eNOS表达上调^[5],改善SAH后CVS。本研究发现SAH后兔BA血管内皮细胞eNOS表达降低、ET-1表达增加,硬膜外应用罗哌卡因纳米微粒显著降低BA血管内皮细胞ET-1表达、增加eNOS表达;而且与硬膜外泵注罗哌卡因效果相当。

综上所述,兔上胸段硬膜外应用罗哌卡因纳米微粒和泵注罗哌卡因均能显著改善SAH后BA血管内皮细胞ET-1/eNOS表达平衡,从而缓解SAH后DCVS,改善神经功能。

【参考文献】

[1] Zacharia BE, Hickman ZL, Grobelny BT, *et al.* Epidemiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurosurg Clin N Am*, 2010, 21(2): 221-233.

[2] Chun-jing H, Shan Q, Guo-dong L, *et al.* Effect of cervical sympathetic block on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits [J]. *Acta Cir Bras*, 2013, 28(2): 89-93.

[3] Wang HM, Li ZX, Li EY, *et al.* Effect of high thoracic epidural symathetic block on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits [J]. *Chin J Anesthesiol*, 2008, 28(2): 234-237.

[4] 林剑清, 陈国忠, 刘 韧, 等. 上胸段硬膜外阻滞对兔基底动脉痉挛后内皮素-1和内皮型一氧化氮合酶基因表达

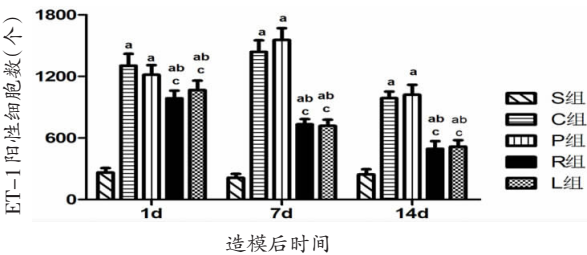


图7 各组大鼠基底动脉血管内皮细胞ET-1表达比较与S组相应值比,a $P<0.05$;与P组相应值比,b $P<0.05$;与C组相应值比,c $P<0.05$;S组:假手术组;C组:SAH组;P组:纳米粒空载体组;R组:纳米粒载药组;L组:泵注药物组;ET-1:内皮素-1

的影响[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(3): 335-337.

[5] Debbage P. Targeted drugs and nanomedicine: present and future [J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(2): 153-172.

[6] 陈志扬, 薛张纲, 蒋 豪. 全麻复合胸段硬膜外阻滞对兔实验性心肌梗塞应激反应的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2000, 20(11): 684-686.

[7] Zhou ML, Shi JX, Zhu JQ, *et al.* Comparison between one- and two-hemorrhage models of cerebral vasospasm in rabbits [J]. *J Neurosci Methods*, 2007, 159(2): 318-324.

[8] Fergusen S, Macdonald RL. Predictors of cerebral infarction in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurosurgery*, 2007, 60(4): 658-667.

[9] Kramer A, Fletcher J. Do endothelin-receptor antagonists prevent delayed neurological deficits and poor outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a meta-analysis [J]. *Stroke*, 2009, 40(10): 3403-3406.

[10] Naredi S, Lambert G, Eden E, *et al.* Increased sympathetic nervous activity in patients with nontraumatic subarachnoid hemorrhage [J]. *Stroke*, 2000, 31(4): 901-906.

[11] Vergouwen MDI, Ildigwe D, MacDonald RL. Cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage contributes to poor outcome by vasospasm-dependent and -independent effects [J]. *Stroke*, 2011, 42(4): 924-929.

[12] Kastner S, Oertel MF, Scharbrodt W, *et al.* Endothelin-1 in plasma, cisternal CSF and microdialysate following aneurysmal SAH [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2005, 147(12): 1271-1279.

[13] 许秀艺, 陈国忠, 吴晓智, 等. 上胸段硬膜外阻滞对脑血管痉挛兔脑组织GR表达及血清炎性细胞因子含量的影响[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2012, 17(3): 161-164.

(2015-04-12收稿, 2015-10-03修回)