

. 实验研究 .

预防性应用辛伐他汀对大鼠脑出血后血肿体积和神经功能的影响

梁智雄 胡 松 彭 岩

【摘要】目的 探讨预防性应用辛伐他汀对大鼠脑出血后血肿体积及神经功能的影响。**方法** 将 96 只雄性成年 SD 大鼠随机分为对照组 (n=24)、脑出血组 (n=24)、高剂量辛伐他汀组 (HS 组, n=24) 和低剂量辛伐他汀组 (LS 组, n=24)。采用 VII 型胶原酶注射法建立大鼠 ICH 模型, 对照组注入 1 μ l 生理盐水。辛伐他汀干预组造模前 2 周给予辛伐他汀灌胃至造模当天 (LS 组 2 mg/kg·d, HS 组 8 mg/kg·d)。造模前检测血清总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平; 造模后 24 h, 每组取 6 只大鼠测定血肿体积; 造模后 5 d, 每组取 6 只大鼠评估肢体运动功能, 然后采用干/湿重法检测脑含水量; 造模后 5 d, 每组取 6 只大鼠采用 FluoroJade B 染色检测血肿周围神经元变性; 造模后 5 d, 每组取 6 只大鼠采用 western blot 检测血肿周围脑组织血管内皮生长因子 (VEGF)、水通道蛋白 (AQP)4、磷酸化胞外信号调节激酶 (p-ERK) 和磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (p-JNK) 表达。**结果** 与对照组相比, 脑出血组血肿体积显著增加 ($P<0.05$), 脑含水量、血肿周围脑组织 FJB 阳性细胞数以及 VEGF、AQP4、p-ERK 和 p-JNK 表达水平均明显增高 ($P<0.05$), 神经功能显著变差 ($P<0.05$)。预防性应用辛伐他汀, 显著缩小血肿体积 ($P<0.05$), 显著降低脑含水量、血肿周围脑组织 FJB 阳性细胞数以及 VEGF、AQP4、p-ERK 和 p-JNK 表达水平 ($P<0.05$), 显著改善大鼠神经功能 ($P<0.05$)。HS 组血清 TC 和 LDL-C 水平、神经功能、血肿周围 VEGF、AQP4、p-ERK 和 p-JNK 表达水平较 LS 组显著改善 ($P<0.05$), 但两组血肿体积、脑含水量、血肿周围变性神经元数量均无统计学差异 ($P>0.05$)。**结论** 预防性应用辛伐他汀可能通过抑制 VEGF 和 AQP4 的表达, 减轻血肿周围脑组织水肿, 减少血肿周围神经元变性, 从而改善大鼠脑出血后神经功能。

【关键词】 脑出血; 脑水肿; 神经功能; 预防性应用; 辛伐他汀; 大鼠

【文章编号】 1009-153X(2018)05-0331-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.34

Effects of prophylactic application of simvastatin on hematoma volume and neurological function in rats with intracerebral hemorrhage

LIANG Zhi-xiong, HU Song, PENG Yan. Department of Critical Care Medicine, The Fifth Hospital of Wuhan City, Wuhan 430050, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of prophylactic application of simvastatin on hematoma volume and neurological function in the rats with intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** Ninety-six male SD rats were randomly divided into 4 groups of 24 animals each, i.e., control, ICH, high dose simvastatin (HS) and low dose simvastatin (LS) groups. The rats received oral administration of simvastatin for 2 weeks before ICH was established in both the HS and LS groups. The serum lipid levels and hematoma volume were measured 24 hours after ICH. The neurological function and water content of brain tissues were determined 5 days after ICH in 6 rats of each group. The neuronal degeneration in 6 rats of each group and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), aquaporin 4 (AQP4), phosphorylated extracellular signal regulated kinase (p-ERK) and phosphorylated c-Jun amino-terminal kinase (p-JNK) in the perihematomal tissues were determined by FluoroJade B (FJB) staining and western blot 5 days after ICH, respectively. **Results** The serum lipid levels, water content of brain tissues and expression levels of VEGF, AQP4, p-ERK and p-JNK were significantly higher in the ICH group than LS group ($P<0.01$) which were significantly higher than HS group ($P<0.01$). The neurological function was significantly better in HS group than LS group ($P<0.05$), which was significantly better than ICH group ($P<0.05$). The number of FJB-positive cells was significantly less in HS and LS groups than ICH group. There was no significant difference in the hematoma volume among ICH, HS and LS groups 24 hours after ICH ($P>0.05$). There was no significant difference in the number of FJB-positive cells between HS and LS groups ($P>0.05$). **Conclusion** Prophylactic application of simvastatin attenuates neurologic defect probably by up-regulating VEGF and AQP4 expressions in the perihematomal tissues and reducing perihematomal edema in rats with ICH.

【Key words】 Prophylactic application; Simvastatin; Intracerebral hemorrhage; Brain edema; Neurological function; Rats

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2018.05.010
作者单位: 430050, 武汉市第五医院重症医学科 (梁智雄、胡 松、彭岩)
通讯作者: 胡 松, E-mail: Husong919@163.com

他汀类药物能降低血低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平, 改善血管内皮功能, 抑制血管内皮炎症反应, 稳定粥样斑块, 被广泛用于心脑血管缺血性事件的一、二级预

防^[1]。但他汀类药物对脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 的影响, 目前尚无明确结论, 特别是近年来, 围绕长期应用他汀类药物是否与 ICH 发生率增加及不良预后相关, 不同的临床研究存在争议^[2]。本研究观察预防性应用辛伐他汀对胶原酶诱导大鼠 ICH 后血肿体积及神经功能的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 清洁级 8 周龄 SD 雄性大鼠共 96 只, 体质量 300~350 g, 由武汉大学医学院实验动物中心提供, 采用随机数字表分为对照组、ICH 组、高剂量辛伐他汀组 (HS 组)、低剂量辛伐他汀组 (LS 组), 每组 24 只。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 ICH 模型建立及处理 采用 VII 型胶原酶注射法建立大鼠 ICH 模型^[3]。大鼠麻醉后固定于立体定位仪 (上海奥尔科特生物科技有限公司), 前囟前 0.2 mm、中线右旁 3.0 mm 钻孔, 硬脑膜下 5.0 mm 注入 VII 型胶原酶 1 μ l (0.2 U)。对照组注入 1 μ l 生理盐水。辛伐他汀干预组造模前 2 周给予辛伐他汀灌胃至造模当天 (LS 组 2 mg/kg·d, HS 组 8 mg/kg·d)。

1.2.2 检测指标

1.2.2.1 生化指标检测 造模前, 经内眦静脉取血 500 μ l, 离心后取血清, 应用全自动生化分析仪检测血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、LDL-C 水平。

1.2.2.2 血肿体积形态学测定 造模后 24 h, 每组各 6 只大鼠, 断头取脑并固定, 沿针道前后做厚约 1 mm 的连续冠状切片, 数码相机摄片, 利用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件计算血肿体积。

1.2.2.3 神经功能评估 造模后 5 d, 每组 6 只大鼠, 评估肢体运动功能^[4]。①转身实验: 当右侧基底节受损时, 大鼠在夹角将倾向于向右转身, 比较向右转身的百分比。②前肢上抬实验: 右侧基底节受损时, 大鼠在轻触右侧触须时, 左侧前肢上抬时出现无力症状, 比较左侧上肢成功上抬的百分比。③前肢应用协调实验: 大鼠放入圆柱玻璃筒时会采用直立和前肢扶壁进行探索, 正常大鼠双侧前肢扶壁次数几乎相等。右侧基底节受损时, 左侧前肢触壁的次数将明显减少。评分为 (右侧-左侧)/总触壁次数 \times 100%。

1.2.2.4 干/湿重法检测脑含水量 神经功能测试后, 麻醉后断头取脑, 取出血侧大脑, 置放于已称重 (a) 的箔纸上, 称得重量 (b), b-a 即为湿重。组织 100 $^{\circ}$ C 置放 24 h 至完全干燥, 取出称重 (c), c-a 即为干重。脑组织含水量 (%) = (湿重-干重)/湿重 \times 100%。

1.2.2.5 Fluoro-Jade B (FJB) 染色 造模后 5 d, 每组 6 只大鼠取脑、固定、梯度蔗糖脱水、OTC 包埋后冰冻切片, 厚度 20 μ m。50 $^{\circ}$ C 烘干; 含 1% 氢氧化钠 80% 乙醇溶液, 室温孵育 5 min; 70% 乙醇溶液孵育 2 min; 蒸馏水洗 2 min; 0.06% 高锰酸钾溶液室温孵育 10 min; 蒸馏水洗 2 min; 0.004% FJB 染色液 (美国 Abcam 公司) 室温避光孵育 20 min; 蒸馏水洗 1 min \times 3 次; 50 $^{\circ}$ C 孵箱烘干; 二甲苯透明、封片。荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司) 采集图像; 每张切片 200 倍视野下随机选取 4 个血肿周围区域, 计数每个区域的阳性细胞数, 最后取平均值。

1.2.2.6 Western Blot 检测蛋白表达 造模后 5 d, 每组随机选取 6 只大鼠, 提取血肿周围组织行 western blot 检测血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 4、磷酸化胞外信号调节激酶 (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, p-ERK) 和磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (phosphorylated c-Jun amino-terminal kinase, p-JNK) 表达。每孔蛋白上样量 30 μ g, 电泳、转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h; 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 1 \times TBST 3 \times 5 min; 荧光二抗 (美国 LI-COR Biosciences 公司) 室温摇床孵育 1 h; 1 \times TBST 3 \times 10 min; 将 PVDF 膜置于 Odyssey 凝胶图像处理系统 (美国 Gene 公司) 显影。

1.2.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行分析; 定量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和 Tukey 检验; $P<0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 TC、LDL-C 及血肿体积比较 与对照组和 ICH 组比较, HS 组和 LS 组血清 TC、LDL-C 水平显著降低 ($P<0.01$), 而且, HS 组血清 TC、LDL-C 水平明显低于 LS 组 ($P<0.05$)。造模后 24 h, 各组大鼠血肿体积均无显著差异 ($P>0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠脑含水量、肢体运动功能及神经元变性比较 ICH 组脑组织含水量较对照组显著增加 ($P<0.01$), HS 组及 LS 组脑组织含水量较 ICH 组明显减少 ($P<0.01$)。HS 组及 LS 组转身实验、前肢上抬实验及前肢应用协调实验评分较 ICH 组显著改善 ($P<0.01$)。ICH 组血肿周围 FJB 阳性细胞数较对照组显著增加 ($P<0.01$), HS 组与 LS 组血肿周围 FJB 阳性细胞数量较 ICH 组明显减少 ($P<0.01$)。见表 2。

2.3 各组大鼠血肿周围蛋白表达比较 与对照组比较, ICH 组大鼠血肿周围 VEGF、AQP4、p-ERK 及

表 1 各组大鼠血清 TC、LDL-C 及血肿体积比较

分析指标	对照组	ICH 组	HS 组	LS 组
血清 TC (mmol/L)	1.696±0.029	1.719±0.018	1.424±0.050 ^{*#△}	1.594±0.020 ^{*#}
血清 LDL-C (mmol/L)	0.484±0.017	0.492±0.022	0.381±0.019 ^{*#△}	0.453±0.014 ^{*#}
血肿体积 (μl)	4.590±0.644	65.881±1.703 [*]	67.273±1.654 [*]	64.936±1.744 [*]

注：与对照组相应值比较，* $P<0.05$ ；与 ICH 组相应值比较，# $P<0.05$ ；与 LS 组相应值比较，△ $P<0.05$ ；ICH：脑出血；TC：总胆固醇；LDL-C：低密度脂蛋白胆固醇

表 2 各组大鼠脑含水量、肢体运动功能实验及 FJB 阳性细胞数比较

分析指标	对照组	ICH 组	HS 组	LS 组
脑含水量 (%)	7.739±0.211	12.375±0.145 [*]	10.221±0.155 ^{*#}	10.110±0.420 ^{*#}
转身实验 (%)	50.000±3.333	75.000±2.687 [*]	61.000±3.480 ^{*#△}	58.000±3.266 ^{*#}
前肢上抬实验 (%)	98.000±1.333	52.000±4.163 [*]	65.000±3.416 ^{*#△}	72.000±3.887 ^{*#}
前肢应用协调实验 (%)	0.500±1.384	29.500±2.833 [*]	20.500±1.893 ^{*#}	19.500±1.675 ^{*#}
FJB 阳性细胞数量 (10 ³ /mm ²)	0.003±0.002	20.540±0.970 [*]	13.205±0.506 ^{*#}	12.521±0.448 ^{*#}

注：与对照组相应值比较，* $P<0.05$ ；与 ICH 组相应值比较，# $P<0.05$ ；与 LS 组相应值比较，△ $P<0.05$ ；ICH：脑出血

表 3 各组血肿周围脑组织 VEGF、AQP4、p-ERK 及 p-JNK 表达水平比较

蛋白	对照组	ICH 组	HS 组	LS 组
VEGF	1.000±0.215	2.699±0.389 [*]	1.582±0.282 ^{*#△}	1.934±0.233 ^{*#}
AQP4	1.000±0.269	2.967±0.335 [*]	1.865±0.376 ^{*#△}	1.954±0.448 ^{*#}
p-ERK	1.000±0.227	2.787±0.292 [*]	1.656±0.273 ^{*#△}	2.004±0.247 ^{*#}
p-JNK	1.000±0.217	2.753±0.346 [*]	1.701±0.204 ^{*#△}	2.119±0.313 ^{*#}

注：与对照组相应值比较，* $P<0.05$ ；与 ICH 组相应值比较，# $P<0.05$ ；与 LS 组相应值比较，△ $P<0.05$ ；ICH：脑出血；VEGF：血管内皮生长因子；AQP4：水通道蛋白 4；p-ERK：磷酸化胞外信号调节激酶；p-JNK：磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶

p-JNK 表达均显著升高 ($P<0.01$)；而 HS 组、LS 组与 ICH 组比较，VEGF、AQP4、p-ERK 及 p-JNK 表达显著降低 ($P<0.01$)。HS 组与 LS 组比较，VEGF、p-ERK 及 p-JNK 表达降低明显 ($P<0.05$)，但 AQP4 水平无显著差异 ($P>0.05$)。见表 3。

3 讨论

ICH 病死率、致残率均较高^[5]。他汀类药物除通过竞争性抑制胆固醇合成^[6]、降低血清 LDL-C 外，还具有抗炎、抗氧化应激和神经保护等多重效应^[7]。既往认为他汀类药物通过调脂和神经保护作用改善 ICH 的预后。但近期有研究显示，大剂量他汀类药物增加 ICH 风险^[8]。目前，临床预防使用他汀类药物的安全性以及用药剂量选择还存在争议^[9]。

有学者提出，LDL-C 水平过低与出血性卒中存在相关性，血清胆固醇降低使脑血管内皮细胞间粘附连接减弱，造成血管破裂风险增加^[10]。同时，他汀类药物抑制血小板聚集和增强纤维蛋白溶解，理论上可能增加 ICH 风险^[11]。但这些假设还缺乏足够的

临床和实验证据支持。因此，我们采用胶原酶诱导大鼠 ICH 模型，观察预防性使用辛伐他汀对血脂及出血程度(血肿体积)的影响，结果显示，预防性使用高剂量及低剂量辛伐他汀，血肿大小与 ICH 组无显著差异；同时，高剂量与低剂量他汀组在血脂存在差异情况下，两组间血肿大小亦未显示出差异。这提示预防使用他汀，虽然改变血脂水平，但并未加重 ICH 风险。

脑水肿是 ICH 后致死和致残的主要因素。本研究结果显示，高剂量与低剂量他汀组脑水肿程度均较 ICH 组明显减轻，而且血肿周围 FJB 阳性变性神经元显著减少，行为学检测亦显示，预防性使用辛伐他汀，肢体运动功能显著改善。因此，预防性使用辛伐他汀可减轻大鼠 ICH 后脑水肿，进而减少神经元损伤并改善神经功能。

有研究显示，ICH 后脑组织 VEGF 表达增加，通过促分裂原活化蛋白激酶途径上调 AQP4 水平^[12, 13]。AQP 在体内水稳态调节中有着重要作用，具有 6 种亚型，其中 AQP4 在神经系统分布广泛，与血脑屏

障功能密切相关^[14]。有研究显示,AQP4参与ICH后脑水肿形成^[15]。他汀类药物能调节VEGF表达^[16],而ERK和JNK是促分裂原活化蛋白激酶途径两种关键蛋白。本文结果显示,大鼠ICH后5 d血肿周围脑组织VEGF、AQP4及p-ERK、p-JNK水平显著升高,而预防性使用辛伐他汀能显著降低VEGF、AQP4及p-ERK、p-JNK水平。这提示预防性使用辛伐他汀能下调VEGF及AQP4,从而减轻ICH后脑水肿。

综上所述,预防性使用他汀不加重ICH,能通过下调VEGF及AQP4表达,减轻ICH后脑组织水肿程度,改善神经功能。

【参考文献】

- [1] Feher A, Pusch G, Koltai K, *et al.* Statin therapy in the primary and the secondary prevention of ischaemic cerebrovascular diseases [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 148(2): 131–138.
- [2] Scheitz JF, MacIsaac RL, Abdul-Rahim AH, *et al.* Statins and risk of poststroke hemorrhagic complications [J]. *Neurology*, 2016, 86(17): 1590–1596.
- [3] Ni W, Mao S, Xi G, *et al.* Role of erythrocyte CD47 in intracerebral hematoma clearance [J]. *Stroke*, 2016, 47(2): 505–511.
- [4] Okauchi M, Hua Y, Keep RF, *et al.* Deferoxamine treatment for intracerebral hemorrhage in aged rats: therapeutic time window and optimal duration [J]. *Stroke*, 2010, 41(2): 375–382.
- [5] Poon MT, Fonville AF, Al-Shahi Salman R. Long-term prognosis after intracerebral haemorrhage: systematic review and meta-analysis [J]. *J Neurol Psychiatry*, 2014, 85(6): 660–667.
- [6] McFarland AJ, Anoopkumar-Dukie S, Arora DS, *et al.* Molecular mechanisms underlying the effects of statins in the central nervous system [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 20607–20637.
- [7] Mihos CG, Pineda AM, Santana O. Cardiovascular effects of statins, beyond lipid-lowering properties [J]. *Pharmacol Res*, 2014, 88: 12–19.
- [8] Goldstein LB, Amarenco P, Zivin J, *et al.* Statin treatment and stroke outcome in the stroke prevention by aggressive reduction in cholesterol levels (SPARCL) trial [J]. *Stroke*, 2009, 40(11): 3526–3531.
- [9] Tapia Perez JH, Yildiz OC, Schneider T, *et al.* Meta-analysis of statin use for the acute therapy of spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2015, 24(11): 2521–2526.
- [10] Konishi M, Iso H, Komachi Y, *et al.* Associations of serum total cholesterol, different types of stroke, and stenosis distribution of cerebral arteries [J]. *Stroke*, 1993, 24(7): 954–964.
- [11] Laufs U, Gertz K, Huang P, *et al.* Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice [J]. *Stroke*, 2000, 31(10): 2442–2449.
- [12] Rite I, Machado A, Cano J, *et al.* Intracerebral VEGF injection highly upregulates AQP4 mRNA and protein in the perivascular space and glia limitans externa [J]. *Neurochem Int*, 2008, 52(4–5): 897–903.
- [13] Qi LL, Fang SH, Shi WZ, *et al.* CysLT2 receptor-mediated AQP4 up-regulation is involved in ischemic-like injury through activation of ERK and p38 MAPK in rat astrocytes [J]. *Life Sci*, 2011, 88(1–2): 50–56.
- [14] Kobayashi H, Minami S, Itoh S, *et al.* Aquaporin subtypes in rat cerebral microvessels [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 297(3): 163–166.
- [15] Tang Y, Wu P, Su J, *et al.* Effects of aquaporin-4 on edema formation following intracerebral hemorrhage [J]. *Exp Neurol*, 2010, 223(2): 485–495.
- [16] Sahebkar A, Ponziani MC, Goitre I, *et al.* Does statin therapy reduce plasma VEGF levels in humans: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Metabolism*, 2015, 64(11): 1466–1476.

(2017-12-26收稿,2018-02-11修回)