

. 实验研究 .

法舒地尔对脑出血大鼠神经功能的影响

张先斌 张 珑 余振兴 龚存林 龚笑笑 程祖珏 吕 卿

【摘要】目的 探讨法舒地尔对脑出血大鼠神经功能的保护作用及机制。**方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为:假手术组、模型组、低剂量法舒地尔组(低剂量组)和高剂量法舒地尔组(高剂量组);每组 15 只。通过注射自体脑内动脉血制作脑出血模型,假手术组只暴露硬脑膜,不注射动脉血。低剂量组腹腔注射 1 mg/(kg·d)法舒地尔,高剂量组腹腔注射 10 mg/(kg·d)法舒地尔。模型组和假手术组腹腔注射等体积生理盐水。药物干预 4 周后,使用 Y-迷宫法评价大鼠学习记忆功能,记录大鼠错误反应次数;使用 Longa 法评价大鼠神经功能。干湿重法测定脑组织含水量,使用硝酸溶解法测定 Na^+ 、 K^+ 含量, TUNEL 染色分析神经细胞凋亡率,免疫印迹法分析凋亡相关蛋白表达(Bax、Bcl-2 和 Caspase-3)。**结果** 相比假手术组,模型组大鼠逃离错误次数、Longa 神经功能评分、脑组织含水量、脑组织 Na^+ 离子水平、神经细胞凋亡率、Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),脑组织 K^+ 离子水平、Bcl-2 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。相比模型组,法舒地尔模型逆转大鼠脑出血后上述变化($P<0.01$),而且高剂量法舒地尔明显优于低剂量法舒地尔($P<0.01$)。**结论** 大鼠脑出血后,法舒地尔可以调节神经细胞 Na^+ 、 K^+ 离子平衡并减少脑组织水肿、抑制神经细胞凋亡,保护大鼠神经功能。

【关键词】 脑出血;法舒地尔;神经功能;细胞凋亡;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2020)08-0542-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.34

Effects of fasudil on nerve function in rats after cerebral hemorrhage

ZHANG Xian-bin¹, ZHANG Long¹, YU Zhen-xing¹, GONG Cun-lin¹, GONG Xiao-xiao¹, CHENG Zu-jue², LV Qing³. 1. Department of Neurosurgery, The 908th Hospital of Joint Service Support Force, PLA, Nanchang 330002, China; 2. Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 3. Department of Neurosurgery, De'an County People's Hospital, Jiujiang 330400, China

【Abstract】Objective To explore the protective effect and the mechanism of fasudil on nerve function of rats after intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** Sixty rats were randomly divided into four groups, i.e., sham operation group, model group, low-dose fasudil group and high-dose fasudil group, with 15 rats in each group. The ICH model was made by injecting autologous intracerebral arterial blood. In the sham operation group, only the dura mater was exposed and no arterial blood was injected. The rats in low-dose and high-dose groups were intraperitoneally injected with 1 mg/(kg·d) and 10 mg/(kg·d) fasudil, respectively. The rats in model and sham operation groups were intraperitoneally injected with the same volume of normal saline. After 4 weeks of treatment: the Y-maze method was used to evaluate the learning and memory function of rats, and the number of wrong reactions in rats was recorded; the Longa method was used to evaluate the neurological function of rats; the water content of brain tissue was determined by dry and wet weight method; the Na^+ and K^+ contents were determined by nitric acid dissolution method; the apoptosis rate of nerve cells was analyzed by TUNEL staining, and the apoptosis-related protein expression (Bax, Bcl-2 and Caspase-3) was analyzed by western blotting. **Results** Compared with the sham operation group, the number of times of error escape, Longa nerve function score, brain tissue water content, brain tissue Na^+ level, nerve cell apoptosis rate, and protein expression levels of Caspase-3 and Bax were significantly increased in the model group ($P<0.01$), but brain tissue K^+ level and protein expression level of Bcl-2 were significantly reduced ($P<0.01$). The fasudil reversed the above changes after ICH in rats ($P<0.01$), and the high-dose fasudil was significantly better than the low-dose fasudil ($P<0.01$). **Conclusion** After ICH in rats, fasudil can adjust the balance of Na^+ and K^+ in nerve cells, reduce brain edema and nerve cell apoptosis, and protect rat nerve function.

【Key words】 Intracerebral hemorrhage; Fasudil; Nerve function; Cell apoptosis; Rat

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.08.014

基金项目:江西省卫生计生委科技新技术推广计划(20183534)

作者单位:330002 南昌,中国人民解放军联勤保障部队第 908 医院神经外科(张先斌、张 珑、余振兴、龚存林、龚笑笑);330006 南昌,南昌大学第二附属医院神经外科(程祖珏);330400 江西,德安县人民医院神经外科(吕 卿)

通讯作者:张 珑, E-mail: w8vbe1@163.com

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)致残率、病死率较高^[1]。ICH 继发性炎症反应影响神经系统功能,可导致不可逆性损伤^[2,3]。ICH 后脑血管痉挛是导致病情加重的重要原因,严重影响病人预后^[4]。法舒地尔可有效防治蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛^[5]。本文探讨法舒地尔对 ICH 大鼠神经功能的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 将 SPF 级 3 周龄 SD 大鼠 60 只(广东医学院实验动物中心,粤监证字 2004A029 号)适应性喂养 1 周,采用随机数字表法随机分为四组:假手术组、模型组、低剂量法舒地尔组(简称低剂量组)和高剂量法舒地尔组(简称高剂量组);每组 15 只。

1.2 模型制作 参考周喜燕等^[6]报道方法。10%水合氯醛麻醉大鼠,头部正中皮肤做长约 1 cm 纵切口,使用高速颅骨钻在大鼠冠状缝前 0.2 mm 钻一直径为 1 mm 小孔,直达硬脑膜。然后,暴露右侧股动脉,穿刺并抽取非抗凝动脉血 100 μl,通过钻孔注入大鼠脑内,注射速率为 10 μl/min。假手术组只暴露硬脑膜。

模型成功判断标准^[7]:造模 24 h,使用 Longa 法评价大鼠神经功能:0 分为正常,大鼠无神经功能缺损;1 分大鼠左侧前爪不能完全伸展,轻度神经功能缺损;2 分大鼠左侧前爪不能完全伸展,轻度神经功能缺损;3 分大鼠左侧前爪不能完全伸展,轻度神经功能缺损;4 分大鼠左侧前爪不能完全伸展,轻度神经功能缺损。评分≥2 分认为造模成功。

1.3 药物干预 法舒地尔使用浓度参考吴巧等^[8]报道,避光将 30 mg 法舒地尔加入 18 ml 生理盐水稀释成 1 mg/ml 溶液。低剂量组腹腔注射 1 mg/(kg·d)法舒地尔,高剂量组腹腔注射 10 mg/(kg·d)法舒地尔。模型组和假手术组腹腔注射等体积生理盐水。药物干预 4 周。

1.4 评估指标

1.4.1 大鼠神经功能评估 药物干预后 4 周,使用 Y-迷宫法评价大鼠学习记忆功能,记录大鼠错误反应次数;使用 Longa 法评价大鼠神经功能。

1.4.2 脑组织含水量检测 完成神经功能评估后,每组选 3 只大鼠使用断颈法处死,分离左右脑半球,快速称质量,计为湿质量。随后,放入 90 ℃恒温干燥箱干燥 24 h,取出后称质量,计为干质量。脑含水量=(湿质量-干质量)/干质量×100%。

1.4.3 出血侧神经细胞凋亡检测 完成神经功能评估后,每组选 3 只大鼠断颈处死,取出血侧脑组织,切片后浸于二甲苯中脱蜡,使用不同浓度梯度的酒精脱水,并在蒸馏水中水化。使用磷酸盐缓冲液洗涤并加入 TUNEL 检测液,避光条件下孵育 45 min,使用 DAPI 孵育 5 min 染细胞核。显微镜下观测拍照,每视野计数 100 个脑细胞中阳性细胞数,以凋亡阳性细胞数所占百分比为凋亡指数。

1.4.4 出血侧脑组织 Na⁺、K⁺检测 每组选 3 只大鼠,取出血侧脑组织,使用剪刀剪碎后,使用胰蛋白酶消化制成悬液,使用硝酸溶解法测定 Na⁺、K⁺含量。

1.4.5 HE 染色观察大鼠脑组织 每组选 3 只大鼠,取大鼠出血侧大脑脑组织,常规 HE 染色后在 10×40 的倍镜下观察大鼠脑组织情况。

1.4.6 免疫印迹法检测细胞凋亡相关蛋白表达水平 每组取 3 只大鼠,取出血侧脑组织,使用免疫印迹法检测 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达。使用胰蛋白酶消化脑组织后,提取总蛋白,使用半干法转移到 PVDF 膜,置于 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后加入一抗、二抗,以β-actin 为内参,采用显色液显色后行吸光度分析,计算各蛋白相对表达量。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件分析;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验和单因素方差分析;检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 大鼠学习记忆功能和神经功能评分结果 相比假手术组,模型组逃离错误次数和 Longa 神经功能评分均显著升高(*P*<0.01);相比模型组,高、低剂量组逃离错误次数和神经功能评分均显著降低(*P*<0.01);高剂量组逃离错误次数和神经功能评分均显著低于低剂量组(*P*<0.01)。见表 1。

2.2 大鼠脑组织含水量及 Na⁺、K⁺水平 相比假手术组,模型组脑组织含水量及 Na⁺、K⁺水平均显著升高(*P*<0.01);相比模型组,高、低剂量组脑组织含水量及 Na⁺、K⁺水平均显著降低(*P*<0.01);高剂量组脑组

表 1 各组大鼠学习记忆功能和神经功能评分比较

组别	逃离错误次数(次)	神经功能评分(分)
假手术组	3.04±1.11	0.01±0.01
模型组	13.41±3.87*	4.11±0.35*
低剂量组	9.36±2.36#	2.50±0.35#
高剂量组	6.00±2.50#Δ	1.00±0.20#Δ

注:与假手术组相比,* *P*<0.01;与模型组相比,# *P*<0.01;与低剂量组相比,Δ *P*<0.01

织含水量及Na⁺、K⁺水平显著低于低剂量组($P<0.01$)。见表2。

2.3 大鼠神经细胞凋亡率 相比假手术组,模型组神经细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);相比模型组,高、低剂量组神经细胞凋亡率显著降低($P<0.05$);高剂量组神经细胞凋亡率显著低于低剂量组($P<0.05$)。

见图1。
2.4 HE染色观察大鼠脑组织病理变化 假手术组大鼠脑组织细胞分布均匀,无坏死细胞;模型组大鼠脑细胞分布散乱,且数量缺失明显增多,坏死细胞较多;低剂量组细胞分布较为均匀,且坏死细胞较少;高剂量组大鼠脑细胞分布均匀,且基本无坏死细胞

表2 各组大鼠脑组织含水量及Na⁺、K⁺离子水平比较

组别	脑组织含水量(%)	Na ⁺ (μmol/g)	K ⁺ (μmol/g)
假手术组	77.32±0.45	91.01±9.50	229.97±30.47
模型组	84.00±0.91 [*]	300.25±49.75 [*]	160.50±21.77 [*]
低剂量组	80.20±0.70 ^{*#}	95.50±11.00 ^{*#}	190.37±25.07 ^{*#}
高剂量组	78.30±0.60 ^{*#Δ}	80.47±10.14 ^{*#Δ}	219.36±21.25 ^{*#Δ}

注:与假手术组相比,^{*} $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.01$;与低剂量组相比,^Δ $P<0.01$

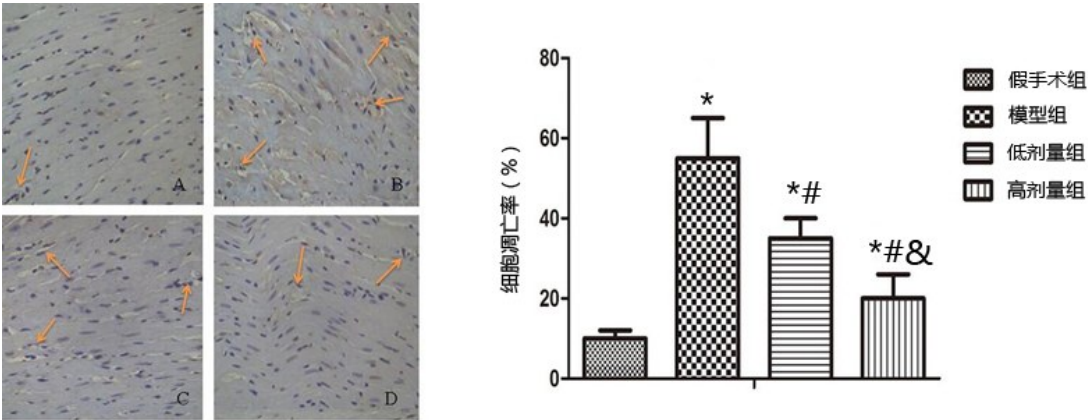


图1 TUNEL染色比较各组大鼠神经细胞凋亡率(↑示凋亡细胞)

A. 假手术组;B. 模型组;C. 低剂量组;D. 高剂量组;与假手术组比,^{*} $P<0.05$;与模型组比,[#] $P<0.05$;与低剂量组比,[&] $P<0.05$

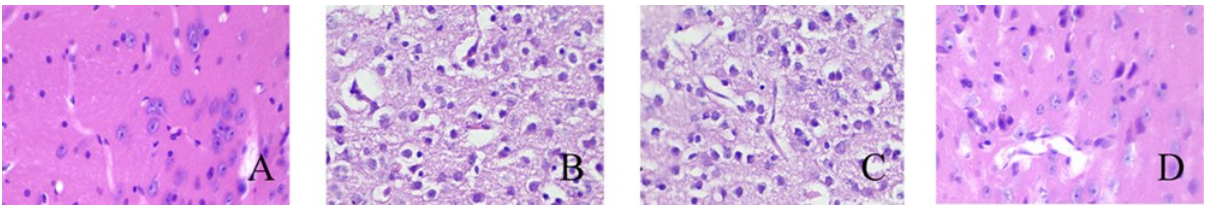


图2 观察大鼠脑组织病理变化(HE,×400)

A. 假手术组;B. 模型组;C. 低剂量组;D. 高剂量组

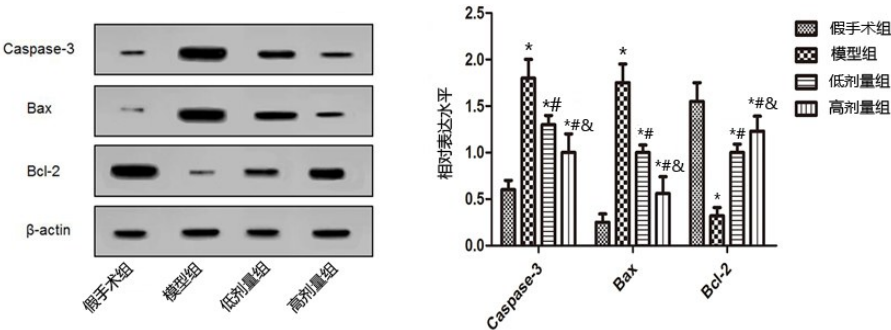


图3 各组大鼠出血侧脑组织细胞凋亡相关蛋白表达水平比较

与假手术组相比,^{*} $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.01$;与低剂量组相比,[&] $P<0.01$

胞。见图 2。

2.5 细胞凋亡相关蛋白表达情况 相比假手术组,模型组大鼠脑组织 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著升高,Bcl-2 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);相比模型组,高、低剂量法舒地尔组大鼠脑组织 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著降低,Bcl-2 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);相比低剂量组,高剂量组大鼠脑组织 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著降低,Bcl-2 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。见图 3。

3 讨论

法舒地尔通过增加肌球蛋白轻链磷酸酶的活性扩张血管,降低内皮细胞的张力,改善脑组织微循环,同时可拮抗炎性因子,保护神经功能^[9]。ICH 不仅使脑组织含水量显著增加,脑组织 Na⁺、K⁺离子浓度也会发生改变。当脑部受到损伤,神经细胞 ATP 能量供给会受到影响,使得 Na⁺、K⁺离子的浓度梯度不能维持,引起细胞内 Na⁺增多,使细胞膜除极,从而引起钙内流及谷氨酸受体介导的一系列损伤机制。同时细胞外 K⁺增多,可使细胞膜持续去极化而影响兴奋传导、递质释放等。本研究发现,相比模型组,低剂量组脑组织含水量、Na⁺离子水平显著降低,K⁺离子水平显著升高;说明盐酸法舒地尔可以有效抑制脑组织水肿,同时调节脑组织内 Na⁺、K⁺离子平衡。这与谢芹和尤春景^[10]研究类似。

大鼠脑神经功能和神经细胞凋亡有密切联系。当大鼠神经细胞收到凋亡信号后,神经细胞会发生凋亡^[11]。大鼠神经细胞的凋亡受基因的调控,Bcl-2 表达下降、Bax 表达上升,促进细胞凋亡;Bcl-2 表达升高、Bax 表达降低,则抑制细胞凋亡^[12]。Caspase-3 通过剪切底物,引起级联反应,最终导致细胞凋亡^[13]。本研究发现,相比模型组,高、低剂量组大鼠脑神经细胞凋亡率显著降低,且 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著降低,Bcl-2 蛋白表达水平显著升高。说明法舒地尔可以调控凋亡基因的表达,抑制神经细胞的凋亡^[14]。

综上所述,大鼠脑出血后,法舒地尔可以调节神经细胞 Na⁺、K⁺离子平衡,减少脑组织水肿,抑制神经细胞凋亡,保护大鼠神经功能。

【参考文献】

[1] Gioia L, Klahr A, Kate M, *et al.* The intracerebral hemorrhage acutely decreasing arterial pressure trial II (ICH

ADAPT II) protocol [J]. BMC Neurol, 2017, 17(1): 100-101.

[2] Cai JC, Liu W, Lu F, *et al.* Resveratrol attenuates neurological deficit and neuroinflammation following intracerebral hemorrhage [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(5): 4131-4138.

[3] 蔡楚伟,张培峰,黄楚明,等. 原发性与继发性基底节区脑出血的人口学特点、临床及影像学特征研究[J]. 中国实用医药,2017,12(35):39-41.

[4] 李丽敏,张昆仑,赵迎春,等. 盐酸法舒地尔对脑出血大鼠脑血管痉挛的作用研究[J]. 脑与神经疾病杂志,2017,25(11):677-681.

[5] 周 昉,党红星,陈应富,等. Rho 激酶抑制剂对先天性膈疝大鼠模型胎仔肺血管重构的作用[J]. 重庆医科大学学报,2018,43(3):343-347.

[6] 周喜燕,于 森,崔焕新. 脑出血大鼠模型中血脑屏障通透性变化与细胞凋亡、炎症及应激反应激活的相关性研究[J]. 海南医学院学报,2018,24(14):1299-1302.

[7] 李中华,张 贺,刘 冰,等. 不同压力高压氧对实验性脑出血大鼠模型血肿周围水肿及 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2014,4(19):5501-5503.

[8] 吴 巧,马康华,张晓刚,等. Rho 激酶抑制剂对大鼠血管内皮的保护作用及 eNOS 表达的影响[J]. 解放军医学杂志,2012,37(11):1044-1049.

[9] Fujimura M, Vsuki F, Makamura A, *et al.* Fasudil, a ROCK inhibitor, recovers methylmercury-induced axonal degeneration by changing microglial phenotype in rats [J]. Toxicol Sci, 2018, 168(1):126-136..

[10] 谢 芹,尤春景. 高压氧对实验性脑出血大鼠的治疗作用 [J]. 中国康复,2004,19(2):75-77.

[11] 马玉东,宋 君,张海波. 神经干细胞移植对脑外伤大鼠神经功能及脑组织 Bcl-2 与 Bax 表达的影响[J]. 解剖科学进展,2018,24(1):19-21,25.

[12] 丁晨雨,胡利双,李 云,等. 低氧胁迫对鲢心肌细胞凋亡及其调控基因 Bax、Bcl-2 表达的影响[J]. 淡水渔业,2018,48(2):10-15.

[13] 王吉锡,邓伟生,王凤儒,等. 甘草提取物的有效部位诱导人宫颈癌 HeLa 细胞株凋亡及对凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 表达的影响[J]. 实用肿瘤学杂志,2017,31(5):390-395.

[14] Zhang LC, Li QH, Liu Z, *et al.* Protective effects of a rho kinase inhibitor on paraquat-induced acute lung injuries in rats [J]. Inflammation, 2018, 41(6): 2171-2183.