

. 实验研究 .

舒芬太尼对大鼠蛛网膜下腔出血后脑损伤的保护作用

周有东 马金阳 黄 松 胡火军 符常涛 袁 高 郭金满 汪 雷

【摘要】目的 探讨舒芬太尼对大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后脑损伤的作用及其机制。**方法** 取60只成年SD大鼠随机分为假手术组、模型组和舒芬太尼组,每组20只。采用血管内穿孔法建立SAH模型,舒芬太尼组建模后6 h尾静脉注射舒芬太尼溶液(5 μg/kg,1次/d,连续3周),假手术组和模型组尾静脉注射等量生理盐水。造模后1、2、21 d,采用改良改良神经严重性量表(mNSS)评分评估神经功能;末次神经功能评估结束后,采用湿干重比法测定脑含水量,TUNEL染色检测神经元凋亡率,EILSA法测定脑组织MDA、SOD、GSH-PX、IL-1β、IL-6和TNF-α的含量,免疫印迹法检测Nrf2、HO-1、NF-κB p65、BCL-2和cleaved-caspase-3蛋白的表达。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠mNSS显著增高($P<0.001$),脑含水量显著增加($P<0.05$),神经元细胞凋亡率显著增加($P<0.001$),脑组织MDA、TNF-α、IL-1β、IL-6、NF-κB p65和cleaved-caspase-3水平显著升高($P<0.01$),而脑组织SOD、GSH-Px、BCL-2、Nrf2和HO-1水平显著降低($P<0.05$)。与模型组相比,舒芬太尼组大鼠上述改变明显改善($P<0.05$)。**结论** 舒芬太尼对SAH后脑损伤有保护作用,其机制可能其抗细胞凋亡、抗氧化应激和抗炎反应等作用有关。

【关键词】 蛛网膜下腔出血;脑损伤;舒芬太尼;炎症反应;氧化应激;细胞凋亡;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2021)07-0531-06 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.9

Effect of sufentanil on brain injury after subarachnoid hemorrhage in adult rats

ZHOU You-dong, MA Jin-yang, HUANG Song, HU Huo-jun, FU Chang-tao, YUAN Gao, GUO Jin-man, WANG Lei. Institute of Neurology, China Three Gorges University; Department of Neurosurgery, Yichang Central People's Hospital, Yichang 441021, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of sufentanil on the brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH) in adult rats. **Methods** Sixty adult SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and sufentanil group, with 20 rats in each group. The SAH model was established by intravascular perforation. The rats of sufentanil group were injected with sufentanil for 21 days (5 μg/kg, once a day) 6 hours after SAH, and the rats of sham operation and model groups were injected with the same amount of normal saline. The modified modified neurological severity scale (mNSS) score was used to assess neurological function 1, 2 and 21 days after SAH. After the final neurofunction evaluation, the wet-to-dry weight ratio method was used to assess the brain water content, TUNEL staining was used to detect the neuronal apoptosis rate, EILSA method was used to determine the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), interleukin (IL) - 1β, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF-α), and western blotting was used to detect the protein expression of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase 1 (HO-1), nuclear transcription factor-κB (NF-κB) p65, B-cell lymphoma 2 (BCL-2) and cleaved-caspase-3. **Results** Compared with the sham operation group, the mNSS score, the brain water content, the neuronal apoptosis rate, and the levels of MDA, TNF-α, IL-1β, IL-6, NF-κB p65 and cleaved-caspase-3 were significantly increased in the model group ($P<0.05$), while the levels of SOD, GSH-Px, BCL-2, Nrf2 and HO-1 were significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the model group, the above-mentioned changes in the sufentanil group were significantly improved ($P<0.05$). **Conclusions** Shufentanyl has a protective effect on the brain injury after SAH in adult rats, which may be related to the anti-apoptosis, antioxidant stress and anti-inflammatory effects of shufentanyl.

【Key words】 Subarachnoid hemorrhage; Brain injury; Sufentanil; Inflammation; Oxidative stress; Cell apoptosis; Rat

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是多种因素引起的脑卒中的一个亚型,主要原因是颅内动脉瘤破裂,病死率高^[1]。SAH后脑损伤指

SAH后发生的一系列病理生理过程,包括颅内压增高、脑血流量和脑灌注压降低、脑屏障受损、急性血管痉挛、脑水肿、神经炎症及神经元凋亡等^[2]。研究发现活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累和氧化应激反应与SAH后脑损伤和继发性缺血性神经功能障碍密切相关^[3]。临床研究发现,SAH后抗氧化相关酶减少,脂质过氧化物增加,与不良预后密切相关^[4]。有研究应用舒芬太尼治疗脑出血^[5]。本研究探讨舒芬太尼对大鼠SAH后脑损伤的保护作用

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.07.012
作者单位:441021 湖北宜昌,三峡大学神经病学研究所/宜昌市中心人民医院神经外科(周有东、马金阳、黄 松、胡火军、符常涛、袁高、郭金满、汪 雷)
通讯作者:汪 雷,E-mai:onedy@sina.com

及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 60 只健康成年雄性 SD 大鼠, 7~8 周龄, 体重 250~500 g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 许可证号[SCXK(鲁)2019-0003]。该研究经本院动物医学委员会批准, 符合中国实验动物制度科学研究审查委员会关于动物实验的指导指南。60 只大鼠随机分为假手术组、模型组和舒芬太尼组, 每组 20 只。

1.2 动物模型建立及干预 参考文献[6]报道的方法制作 SAH 模型。SD 大鼠适应性喂养 2 周后, 用戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉大鼠, 结扎右侧颈外动脉和颈内动脉, 剪断颈外动脉。4-0 尼龙缝合线沿颈外动脉引入颈内动脉, 直到感觉阻力(约 18 mm), 然后将缝合线再推进约 1 mm 穿透动脉, 迅速撤出缝合线, 结扎颈外动脉, 缝合切口。假手术组仅将缝合线引入颈动脉分叉处感觉阻力时, 拔出缝合线, 不穿透动脉。舒芬太尼组造模后 6 h, 尾静脉注射舒芬太尼溶液, 5 μ g/kg, 1 次/d, 连续 3 周; 假手术组和模型组尾静脉注射等量生理盐水。

1.3 神经功能评估 造模后 1、2、21 d 参考文献[7]报道的方法, 采用改良神经严重性量表(modified neurological severity scale, mNSS)评分评估神经功能。评分范围 0~18 分, 其中完全正常、无神经功能缺损评分为 0 分, 意识丧失或死亡评分为 18 分。

1.4 脑水肿测定 末次神经功能评估结束后, 每组取 5 只大鼠采用干湿重比法测定脑组织含水量。大鼠深度麻醉后, 断头处死, 迅速分离损伤灶半球脑组织, 用滤纸吸干表面水分, 称其重量为湿重; 然后, 置于 105 $^{\circ}$ C 烤箱内 24 h 后称其重量为干重。脑组织含水量=(湿重-干重)/湿重 \times 100%。

1.5 TUNEL 染色检测神经元凋亡 末次神经功能评估结束后, 每组取 5 只大鼠参考文献[8]报道的方法进行 TUNEL 染色。脑组织进行常规切片, PBS 清洗, TritonX-100 通透, 严格按照 TUNEL 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明进行操作。随机选取 5 个高倍镜(\times 400)视野观察, 并计算细胞凋亡率。

1.6 EILSA 测定氧化应激和炎症反应指标 末次神经功能评估结束后, 每组取 5 只大鼠采用参考文献[9]报道的方法测定氧化应激和炎症反应指标。鼠深度麻醉后, 断头处死, 迅速左侧大脑半球组织放入无菌生理盐水中, 匀浆后离心(12 000 转/min 离心 20 min), 取上清液。按照 EILSA 检测试剂盒(武汉赛培

生物科技有限公司)说明操作, 检测上清液肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的含量。

1.7 免疫印迹法检测相关蛋白的表达 末次神经功能评估结束后, 每组取 5 只大鼠采用参考文献[10]报道的方法检测相关蛋白的表达。提取脑组织总蛋白, 使用 BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 然后转移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶 TBST 封闭 1 h, 然后加入一抗[Nrf2(1:500), HO-1(1:500), NF- κ B p65(1:500), BCL-2(1:500), cleaved-caspase-3(1:500); 美国 Invitrogen 公司]4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 冲洗 4 次, 室温下加入二抗(1:1 000)。ECL 试剂盒显影并拍照。采用 ImageJ 软件进行灰度值分析, 以 GAPDH 作为内参对照。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 24.0 软件进行分析; 定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用单因素方差分析和 LSD- t 检验; 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 舒芬太尼对大鼠 SAH 后神经功能的影响 与假手术组相比, 模型组大鼠 mNSS 评分显著增高($P<0.001$)。与模型组相比, 舒芬太尼组大鼠 mNSS 评分显著降低($P<0.01$)。见图 1。

2.2 舒芬太尼对大鼠 SAH 后脑含水量的影响 与假手术组相比, 模型组大鼠脑含水量显著增高($P<0.001$)。与模型组相比, 舒芬太尼组大鼠脑含水量显著降低($P<0.01$)。见图 2。

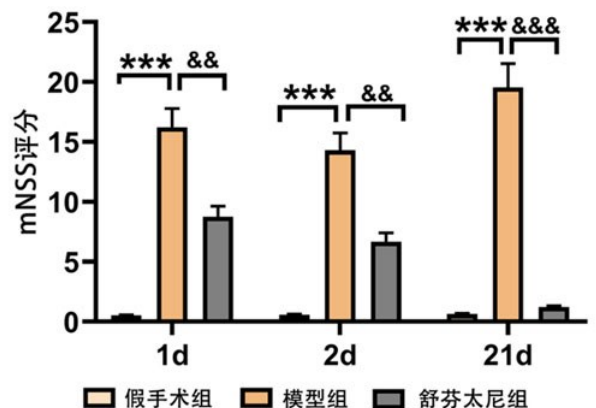


图 1 舒芬太尼对大鼠 SAH 后神经功能的影响

* $P<0.05$; *** $P<0.001$; && $P<0.01$; &&& $P<0.001$; mNSS, 改良神经严重性量表; SAH, 蛛网膜下腔出血

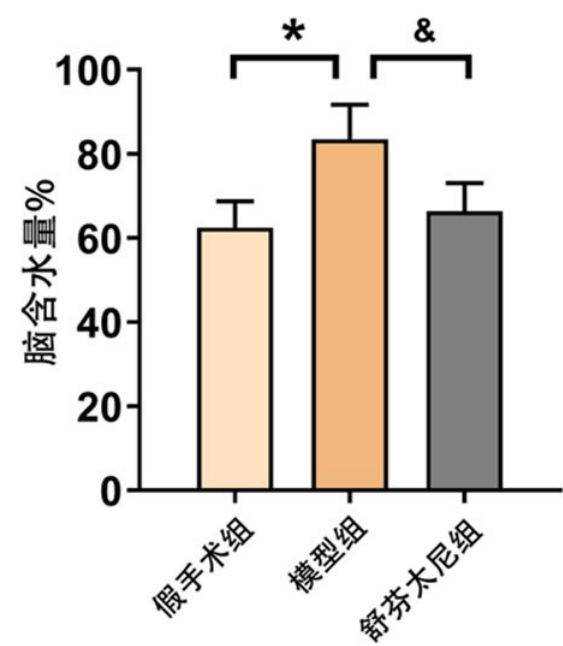


图2 舒芬太尼对大鼠SAH后脑含水量的影响
* $P<0.05$; & $P<0.05$; SAH. 蛛网膜下腔出血

2.3 舒芬太尼对大鼠SAH后神经元凋亡的影响 与假手术组相比,模型组大鼠神经元凋亡率显著增加($P<0.001$)。与模型组相比,舒芬太尼组大鼠神经元凋亡率显著降低($P<0.001$)。见图3。

2.4 舒芬太尼对大鼠SAH后氧化应激和炎症反应的影响 与假手术组相比,模型组大鼠脑组织MDA、TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平均显著升高($P<0.01$)，SOD和GSH-Px水平显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,舒芬太尼组大鼠脑组织MDA、TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平均显著降低($P<0.01$)，SOD和GSH-Px

水平显著增高($P<0.01$)。见图4。

2.5 舒芬太尼对大鼠脑组织BCL-2、Nrf2、HO-1、NF-kB p65及cleaved-caspase-3蛋白表达的影响 与假手术组相比,模型组大鼠脑组织BCL-2、Nrf2和HO-1蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)，NF-kB p65和cleaved-caspase-3蛋白表达水平显著增高($P<0.05$)。与模型组相比,舒芬太尼组大鼠脑组织BCL-2、Nrf2和HO-1蛋白表达水平显著增高($P<0.05$)，NF-kB p65和cleaved-caspase-3蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。见图5。

3 讨论

SAH后脑损伤常伴有神经元凋亡和脑水肿,这是造成神经功能缺损的主要原因^[11]。近年来,越来越多的研究集中于揭示脑损伤的分子机制。研究表明SAH后,脑组织发生多种病理性改变,包括脑缺血、血脑屏障破坏、脑水肿和细胞凋亡^[12]。有研究发现,caspase抑制剂可以减少SAH后皮层细胞凋亡和基底膜caspase蛋白表达,改善神经行为功能和脑水肿^[13]。caspase-3活化是导致细胞凋亡的关键步骤,但是却可以被BCL-2阻断。本研究发现舒芬太尼明显降低大鼠SAH后脑组织含水量、神经元凋亡率以及cleaved-caspase-3的表达水平,明显增高BCL-2蛋白表达水平。这提示舒芬太尼可能提高抑制caspase-3,缓解脑水肿,减少神经元凋亡。

越来越多的证据表明,神经炎症在SAH后脑损伤的发病机制中起关键作用,抗炎治疗有益于改善SAH^[14,15]。在SAH早期,小胶质细胞过度激活可以分

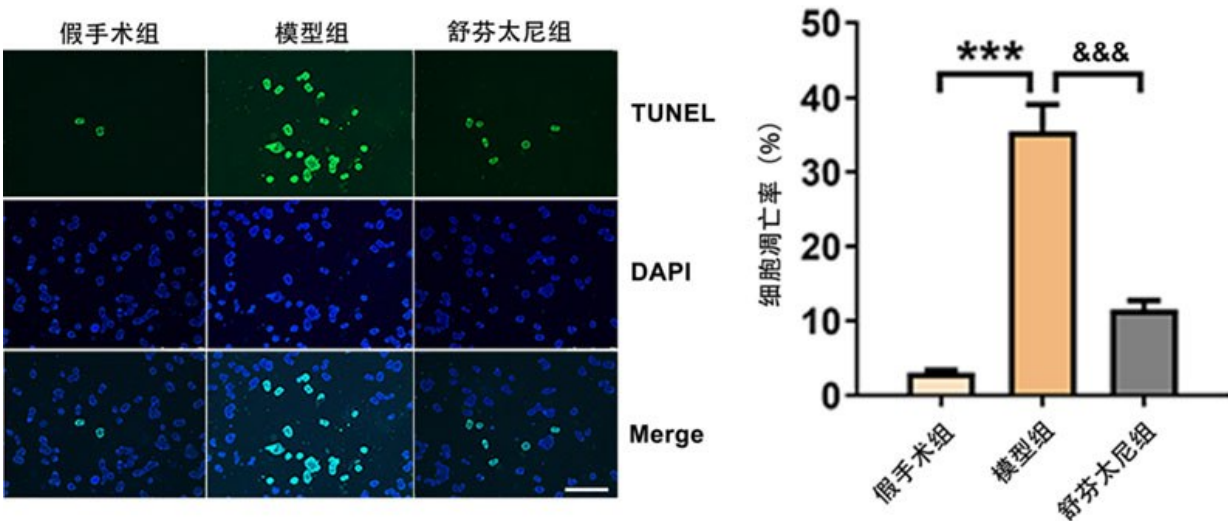


图3 舒芬太尼对大鼠SAH后神经元凋亡的影响
*** $P<0.001$; &&& $P<0.001$; SAH. 蛛网膜下腔出血

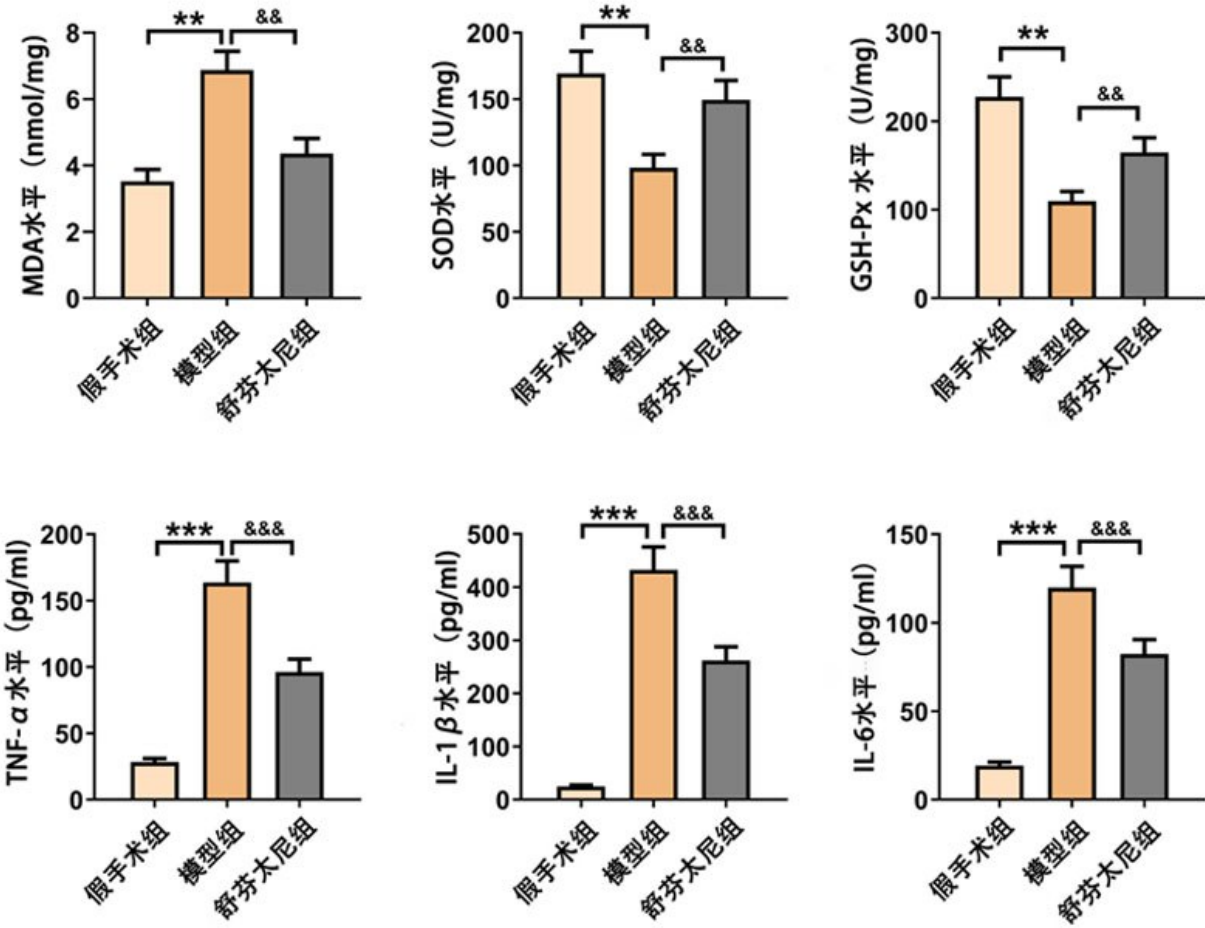


图4 舒芬太尼对大鼠SAH后氧化应激和炎症反应相关指标的影响

** $P<0.01$; *** $P<0.001$; && $P<0.01$; &&& $P<0.001$; SAH. 蛛网膜下腔出血; MDA. 丙二醛; SOD. 超氧化物歧化酶; GSH-Px. 谷胱甘肽过氧化物酶; TNF- α . 肿瘤坏死因子- α ; IL-1 β . 白细胞介素-1 β ; IL-6. 白细胞介素-6

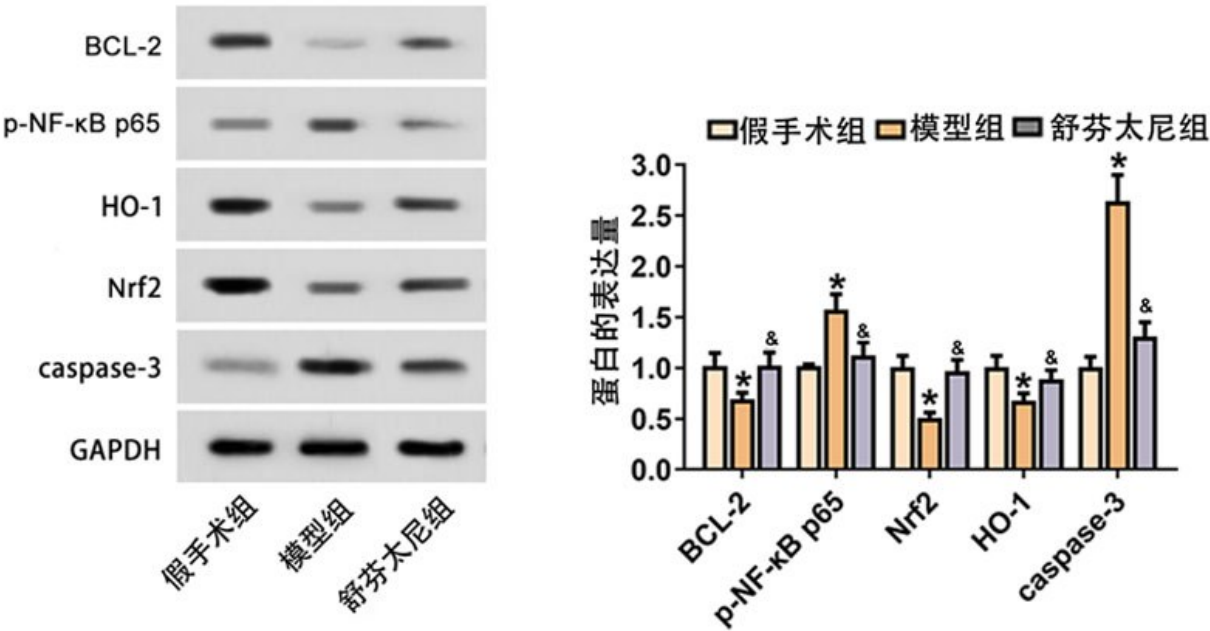


图5 舒芬太尼对大鼠SAH后氧化应激和细胞凋亡相关蛋白表达的影响

与假手术组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, & $P<0.05$; SAH. 蛛网膜下腔出血

泌炎症因子,加重脑损伤,因此抑制小胶质细胞的激活可减轻SAH后脑损伤^[16,17]。NF- κ B是细胞内重要的核转录因子,参与机体的炎症反应,一旦被激活,促进炎症因子大量释放,从而导致炎症反应。另外,SAH会导致产生过多的活性氧和活性氮,包括羟自由基、超氧化阴离子、过氧化氢、一氧化氮和过氧亚硝酸盐,消耗了酶促和非酶促抗氧化剂防御系统^[18],导致氧化应激损伤^[19]。本研究发现舒芬太尼明显抑制大鼠SAH脑组织NF- κ B p65表达,显著降低炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的水平以及脂质过氧化产物MDA水平,显著增加抗氧化剂SOD和GSH-Px水平。这提示舒芬太尼对大鼠SAH后氧化应激反应和炎症反应具有抑制作用。

有研究表明在SAH大鼠模型中,苦豆碱通过Nrf2-ARE途径减少氧化应激损伤,改善神经功能^[20]。Nrf2是抗氧化剂,能够调控细胞氧化损伤,而HO-1是Nrf2-ARE信号通路下游重要的抗氧化与解毒蛋白,对SAH后脑损伤具有减轻氧化应激损伤和抑制细胞凋亡的作用^[21]。本研究发现舒芬太尼显著降低大鼠SAH脑组织Nrf2和HO-1蛋白表达;因此,我们推测舒芬太尼可能通过激活Nrf2/HO-1信号通路缓解SAH诱导的氧化应激反应。

综上所述,舒芬太尼对SAH后脑损伤有保护作用,其机制可能其抗细胞凋亡、抗氧化应激和抗炎反应等作用有关。

【参考文献】

[1] 魏 容,杨 娜,胥国强,等. Treg,sICAM-1水平与蛛网膜下腔出血严重程度的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(2):244-247.

[2] 廖艺斐,张 慧,邹良玉. 神经炎症在动脉瘤性蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的作用[J]. 中国卒中杂志,2021,16(1):92-96.

[3] Sehba FA, Hou J, Pluta RM, *et al.* The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Prog Neurobiol, 2012, 97(1): 14-37.

[4] Hsieh YP, Lin CL, Shiue AL, *et al.* Correlation of F4-neuroprostanes levels in cerebrospinal fluid with outcome of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in humans [J]. Free Rad Biol Med, 2009, 47(6): 814-824.

[5] 黄善华,许贵花,刘国强. 舒芬太尼持续泵入预防脑出血再出血的临床效果观察[J]. 黑龙江医药,2021,34(2): 315-317.

[6] 谢雨珂,郭科成,彭建华,等. 双糖链蛋白聚糖对小鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中神经元凋亡的影响[J]. 中华神经医学杂志,2020,19(2):138-145.

[7] Yang W, Chen X, Pan J, *et al.* Malibatol A protects against brain injury through reversing mitochondrial dysfunction in experimental stroke [J]. Neurochem Int, 2015, 80: 33-40.

[8] 彭金亮,熊丽娇,刘向红. 银杏二萜内酯葡胺对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 天津医药,2021,49(2):153-158.

[9] 旦增赤来,李西锋,刘文超,等. 橙皮素对蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中炎症反应的调控作用研究[J]. 中华神经医学杂志,2019,18(9):904-909.

[10] Xu W, Li T, Gao L, *et al.* Apelin-13/APJ system attenuates early brain injury via suppression of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation and oxidative stress in a AMPK-dependent manner after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 247.

[11] Claassen J, Carhuapoma JR, Kreiter KT, *et al.* Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: frequency, predictors, and impact on outcome [J]. Stroke, 2002; 33(5): 1225-1232.

[12] Huo L, Zhang J, Sun XB, *et al.* Melatonin activates the Nrf2-ARE pathway when it protects against early brain injury in a subarachnoid hemorrhage model [J]. J Pineal Res, 2012, 53(2): 129-137.

[13] Cheng G, Liu X, Wei L, *et al.* Anti-apoptotic and neuroprotective effects of tetramethylpyrazine following subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Auton Neurosci, 2008, 141(1-2): 22-30.

[14] Zhang DD, Yan HY, Li H, *et al.* TGF β -activated kinase 1 (TAK1) inhibition by 5Z-7-oxozeanol attenuates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. J Biol Chem, 2015, 290(32): 19900-19909.

[15] He Y, Xu L, Li B, *et al.* Macrophage-inducible C-type lectin/spleen tyrosine kinase signaling pathway contributes to neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Stroke, 2015, 46(8): 2277-2286.

[16] Murakami K, Koide M, Dumont TM, *et al.* Subarachnoid hemorrhage induces gliosis and increased expression of the pro-inflammatory cytokine high mobility group box 1 protein [J]. Transl Stroke Res, 2011, 2(1): 72-79.

[17] Hanafy KA. The role of microglia and the TLR4 pathway in neuronal apoptosis and vasospasm after subarachnoid

hemorrhage [J]. Bio Med Central, 2013, 10(1): 83.

[18] Ostrowski RP, Colohan AR, Zhang JH. Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Neurol Res, 2006, 28(4): 399-414.

[19] Ayer RE, Zhang JH. Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm [J]. Acta Neurochir Suppl, 2008, 104: 33-41.

[20] Song SB, Chen YM, Han F, *et al.* Alopine activates the

Nrf2-ARE pathway when ameliorating early brain injury in a subarachnoid hemorrhage model [J]. Exp Therap Med, 2018, 15(4): 3847-3855.

[21] 李 玲, 朵 辰, 罗 密, 等. 原花青素对大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的保护作用[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(6): 1059-1064.

(2021-05-19 收稿, 2021-06-23 修回)

(上接第 530 页)

在正常静脉引流的情况下,板障静脉在 DSA 上不显影。在病理情况下,例如静脉窦血栓、外伤、脑膜瘤,板障静脉有可能会增粗扩张。本文病例板障静脉为 DAVF 引流静脉一部分,使板障静脉扩张显影。

在额后部及顶部硬膜下存在恒定及较大的静脉间腔,主要接受硬膜内及硬脑膜动脉相伴行硬脑膜静脉的回流。在正常情况下,静脉间腔回流入上矢状窦,大脑镰静脉连接静脉间腔及上矢状窦。在病理情况下,部分 DAVF 病例发病因素与脑静脉窦血栓形成有关,静脉间腔与上矢状窦之间连接发生闭塞,静脉间腔通过大脑镰静脉逆流入皮层静脉,导致局部静脉高压性脑组织水肿及脑出血。本文病例瘘口位于额部及颞部硬膜上,脑膜中动脉前支及后支供血,瘘口近端引流静脉经骨导静脉回流入额骨板障静脉及颞前板障静脉,额骨板障静脉与颞前板障静脉在顶部汇合共同回流入静脉间腔,因静脉间腔与上矢状窦之间发生闭塞,从而回流入大脑镰静脉,导致皮层静脉的逆流,引起局部脑组织水肿及脑内出血。

与板障静脉沟通的 DAVF 开颅手术及血管内治疗均可治愈。开手术可达到治愈的目的,但文献报道存在一定的手术风险及并发症^[8]。血管内治疗主要有经动脉入路及经静脉入路两种方式,如果存在合适的静脉通路,经静脉入路可提高治愈率。因经静脉无适宜的通路,本文病例采用经动脉入路,微导管置于瘘口处,注入 Onyx 胶,凭借 Onyx 胶的良好弥散效果,封堵瘘口、板障静脉及硬膜下部分静脉间腔,从而达到治愈目的,没有发生手术并发症。

总之,与板障静脉沟通的 DAVF 并发颅内出血为罕见疾病,血管内治疗闭塞瘘口及硬膜下近端引

流静脉可达到治愈。

【参考文献】

[1] 马廉亭,谢天浩,徐召溪. 脑动静脉畸形、硬脑膜动静脉瘘与软脑膜动静脉瘘的鉴别[J]. 中国临床神经外科杂志, 2019, 24(6): 321-323.

[2] Benndorf G, Lehmann TN. Bilateral diploic arteriovenous fistula causing scalp hematoma [J]. J Neurosurg, 2004, 100: 950-955.

[3] Burger IM, Tamargo RJ, Broussard J, *et al.* Combined surgical and endovascular treatment of a spontaneous diploic arteriovenous fistula: case report [J]. J Neurosurg, 2005, 103: 179-181.

[4] Ishii R, Ueki K, Ito J. Traumatic fistula between a lacerated middle meningeal artery and a diploic vein: case report [J]. J Neurosurg, 1976, 44: 241-244.

[5] Shim JH, Yoon SM, Shim JJ, *et al.* A case of intraosseous dural arteriovenous fistulas involving diploic vein treated with transarterial onyx embolization [J]. J Korean Neurosurg Soc, 2011, 50: 260-263.

[6] Yako R, Masuo O, Kubo K, *et al.* A case of dural arteriovenous fistula draining to the diploic vein presenting with intracerebral hemorrhage [J]. J Neurosurg, 2016, 124(3): 726-729.

[7] García-González U, Cavalcanti DD, Agrawal A, *et al.* The diploic venous system: surgical anatomy and neurosurgical implications [J]. Neurosurg Focus, 2009, 27(5): E2.

[8] Mahmood A, Malik GM. Dural arteriovenous malformations of the skull base [J]. Neurol Res, 2003, 25: 860-864.

(2021-05-20 收稿, 2021-05-24 修回)