

法舒地尔对 ICH 大鼠炎症因子水平、神经及认知功能的影响

符 晶,孟开顺*

(海南省三亚市人民医院老年病科,海南 三亚 572000)

摘 要: 为探讨盐酸法舒地尔治疗脑出血(ICH)大鼠对炎症因子水平、神经功能及认知功能恢复的影响。选取健康成年 Wistar 雄性大鼠随机分为对照组、模型组和治疗组,模型组和治疗组采用非抗凝自体股动脉血注入右侧尾状核建立 ICH 大鼠模型,治疗组采取腹腔注射盐酸法舒地尔每天 12 mg/kg,模型组和对照组均给予等量的生理盐水;对比各组大鼠的 Morris 水迷宫试验逃避潜伏期、穿越平台次数、神经功能缺损评分、IL-6、TNF- α 、NF- κ B。结果显示,盐酸法舒地尔治疗 ICH 大鼠能显著的改善大鼠神经及认知功能、降低脑出血后大鼠的炎症反应程度。

关键词: 盐酸法舒地尔; 脑出血; 炎症反应; 神经功能; 认知功能

中图分类号:R743.34

文献标识码:A

Effect of fasudil on inflammatory response, neurological and cognitive function recovery in ICH rats

FU Jing, MENG Kaishun*

(Department of Geriatrics, Sanya People's Hospital, Sanya 572000, Hainan, China)

Abstract: To investigate the effects of fasudil hydrochloride on the recovery of inflammatory factors, neurological function and cognitive function in rats with cerebral hemorrhage (ICH). Healthy adult Wistar male rats were randomly divided into model group, treatment group and control group. Model group and treatment group were injected with non-anticoagulated autologous femoral artery blood into the right caudate nucleus to establish ICH rat model. The treatment group received intraperitoneal injection of hydrochloric acid, Fasudil 12mg/kg per day, the model group and the control group were given the same amount of normal saline; it compared with the escape latency of the Morris water maze test, the number of crossing platforms, the neurological deficit score, IL-6, TNF- α , NF- κ B of each group. The results showed that fasudil hydrochloride treatment of ICH rats can significantly improve the neurological and cognitive functions of rats, and reduce the degree of inflammatory response in rats after cerebral hemorrhage.

Key words: Fasudil hydrochloride; cerebral hemorrhage; inflammatory response; neurological function; cognitive function

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)指的是非外伤性脑实质内血管破裂引起的出血,引起神经细胞的血供不足,导致周围的神经组织受到压迫而引发代谢及功能障碍^[1]。脑出血病情凶险,死亡率高,是高血压病最严重的并发症之一,占全部脑卒中的 20% ~ 30%^[2]。目前 ICH 的发病机制尚不明确,常见的病因有:微动脉瘤破裂、脂肪玻璃样变或纤维坏死、脑动脉粥样硬化以及脑动脉的外膜和中层在结构上薄弱等^[3]。法舒地尔是 Rho/Roek 信号通路的选择性蛋白激酶抑制剂,Rho/Rho 激酶信号

通路可以为多种心血管疾病的预防和治疗提供治疗靶点。法舒地尔在急性脑缺血中的作用已得到证实^[4],但其对于脑出血脑损伤的影响及相关机制研究较少。本研究探讨盐酸法舒地尔治疗脑出血(ICH)大鼠对炎症因子水平、大鼠神经功能及认知功能恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取健康成年 Wistar 雄性大鼠 36 只,12 周龄,体重 250.4 $\pm$ 9.0 g,均为 SPF 级别,喂养于室温 23 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C、相对湿度 45% ~ 60%、光照 12 h 的环境

中。采用随机数字表法分为对照组、模型组和治疗组,每组 12 只。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备 首先固定大鼠,将大鼠固定在小动物手术台上,使用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,使用从大鼠头部顺着人字缝皮肤切开大约 3~5 cm,露出头骨。在人字缝右边 1 mm 处标记,使用穿孔器垂直钻孔。ICH 大鼠模型采用非抗凝自体股动脉血注入右侧尾状核建立,使用微量进样器沿着小孔注射自体股动脉血 50 μ L,注射时间维持在 5 min 内,随后封闭小孔,缝合伤口。对照组只进行与模型组相同手术不注射药物。

1.2.2 治疗方法 术后 3 组大鼠同条件饲养,治疗组采取腹腔注射盐酸法舒地尔每天 12 mg/kg 治疗,模型组和对照组均给予等量的生理盐水进行腹腔注射。

1.2.3 Morris 水迷宫试验 采用 XR-XM101 通用型 Morris 水迷宫(上海欣软信息科技有限公司),实验训练阶段连续进行 3 天,每天训练 4 次。训练时,将大鼠面向池壁从四个入水点分别放入水池,对比各组大鼠的 Morris 水迷宫试验逃避潜伏期、穿越平台次数,操作步骤按照说明书进行。

1.2.4 神经功能缺损评分 大鼠神经功能评估应用 Longa 评分标准:正常,无神经功能缺损(0 分);左侧前爪不能完全伸展,轻度神经功能缺损(1 分);行走时,大鼠向左侧旋转,中度神经功能缺损(2 分);行走时,大鼠向左侧倾倒,中度神经功能缺损(3 分);不能自发行走,存在意识丧失(4 分)。

1.2.5 实验室指标检测 大鼠眼球取血,3500 r/

min 离心 15 min,取上清,使用 ELISA 法测量血清白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量,所用试剂盒购自上海纪宁生物,操作按照说明书进行。大鼠经麻醉处理后,4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注后断头取脑,免疫组化测定脑组织 NF- κ B 表达,荧光扫描结果。

1.3 统计学方法

数据分析软件采用 SPSS16.0,所有计量数据均应用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分析应用单因素方差分析法,多组间分别进行两两比较应用 LSD-*t* 检验; $P < 0.05$ 说明差异具有统计学显著性。

2 结 果

2.1 大鼠的神经功能缺损评分

在造模后第 1 天至第 14 天,模型组大鼠的 Longa 评分均显著的高于对照组($P < 0.05$),治疗组大鼠的 Longa 评分显著的低于模型组($P < 0.05$)(表 1)。图 1 为各组大鼠在脑出血后 14 天的血肿情况,对照组未发现血肿形成;模型组可见见图 1 所示血肿,血肿周围有较多的炎性细胞浸润;治疗组可见血肿基本被吸收,胶质细胞增生改变。

表 1 各组大鼠的神经功能缺损 Longa 评分比较(分)

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
对照组	0.10 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.04
模型组	1.88 $\pm$ 0.82 ^a	3.11 $\pm$ 0.91 ^a	2.83 $\pm$ 0.58 ^a	2.40 $\pm$ 0.60 ^a
治疗组	1.76 $\pm$ 0.74 ^{ab}	2.51 $\pm$ 0.73 ^{ab}	2.11 $\pm$ 0.69 ^{ab}	1.30 $\pm$ 0.42 ^{ab}

与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ ($n = 12$)

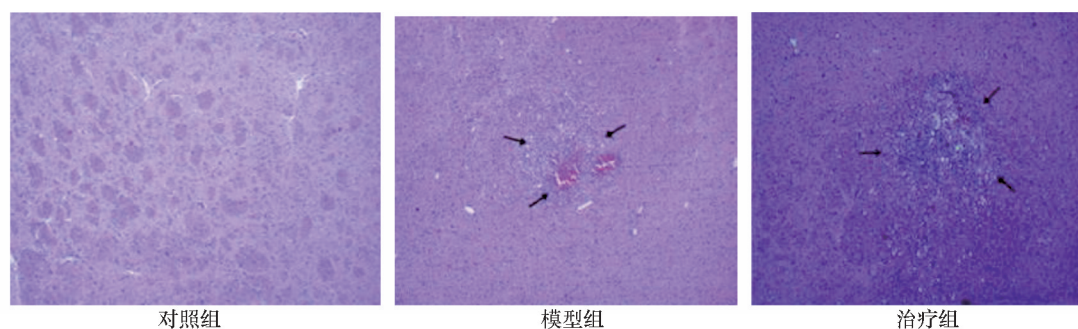


图 1 各组大鼠脑组织血肿情况(HE $\times$ 40)

2.2 大鼠的 Morris 水迷宫试验逃避潜伏期、穿越平台次数

在造模后第 3 天至第 14 天,模型组大鼠的 Morris 水迷宫试验逃避潜伏期高于对照组($P <$

0.05),穿越平台次数显著少于对照组($P < 0.05$);治疗后,治疗组大鼠的 Morris 水迷宫试验逃避潜伏期低于模型组($P < 0.05$),穿越平台次数高于模型组($P < 0.05$);(表 2)。

表2 各组大鼠的 Morris 水迷宫试验逃避潜伏期、穿越平台次数比较

组别	逃避潜伏期(s)		穿越平台次数(次)	
	第3天	第14天	第3天	第14天
对照组	11.6±3.0	11.8±3.6	6.82±1.50	6.90±1.58
模型组	24.7±5.3 ^a	21.6±4.7 ^a	3.18±0.77 ^a	4.20±0.80 ^a
治疗组	19.3±3.8 ^{ab}	15.8±3.9 ^{ab}	4.02±0.90 ^{ab}	5.81±0.80 ^{ab}
<i>F</i>	11.528	9.634	12.004	8.751
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组比较,^a*P*<0.05;与模型组比较,^b*P*<0.05(*n*=12)

2.3 大鼠炎症相关指标

在造模后第3天至第14天,与对照组比较,模型组大鼠的血清 IL-6、TNF-α 显著升高(*P*<0.05);治疗后大鼠血清 IL-6、TNF-α 降低(*P*<0.05)(表3)。

表3 各组大鼠炎症相关指标比较 (pg/mL)

组别	IL-6		TNF-α	
	第3天	第14天	第3天	第14天
对照组	17.2±5.5	16.9±4.8	11.6±4.8	11.2±4.2
模型组	34.2±7.6 ^a	25.0±5.5 ^a	36.9±9.2 ^a	23.1±7.0 ^a
治疗组	29.2±6.3 ^{ab}	20.0±4.3 ^{ab}	28.5±7.0 ^{ab}	16.5±5.9 ^{ab}
<i>F</i>	22.570	15.548	28.064	17.002
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组比较,^a*P*<0.05;与模型组比较,^b*P*<0.05(*n*=12)

2.4 大鼠脑组织中的 NF-κB 表达

在造模后第14天,处死大鼠,取出脑组织,可见

模型组中的 NF-κB 阳性表达细胞较多,治疗组的 NF-κB 阳性表达细胞显著减少(图2)。阳性定量分析见表4,模型组大鼠脑组织中的 NF-κB 表达高于对照组(*P*<0.05);治疗组大鼠脑组织中的 NF-κB 表达低于模型组(*P*<0.05)。

表4 各组大鼠脑组织中的 NF-κB 表达相对值比较

组别	NF-κB	<i>F</i>	<i>P</i>
对照组	8.33±1.76		
模型组	47.02±5.38 ^a	69.035	0.000
治疗组	17.30±2.81 ^{ab}		

与对照组比较,^a*P*<0.05;与模型组比较,^b*P*<0.05(*n*=12)

3 讨论

脑出血具有较高的致残率和死亡率,已经成为威胁老年人健康的最重要因素。寻找有效的临床诊治措施十分必要。目前 ICH 的发病机制尚不明确,临床中绝大多数脑出血是因高血压合并小动脉硬化引起的。研究认为,长期的高血压可导致血管壁纤维素样坏死或脂质透明变性,形成小动脉瘤或夹层动脉瘤^[6]。血压骤然升高时,血管容易破裂,血液进入脑组织形成血肿。此外,高血压会导致远端小血管痉挛,引发出血。脑出血的诱发因素有很多,发病机制尚未完全明确,所以缺乏功效明显的药物^[7]。因此目前研究探讨脑出血的发生发展机制及研发高效的药物具有重要的临床意义。

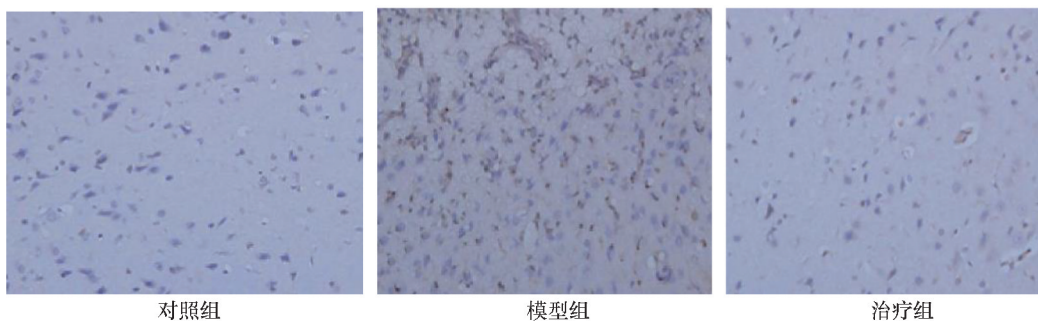


图2 各组大鼠脑组织免疫组化染色(SP 200×)

分子免疫学和分子生物学的研究表明^[8],炎症反应在脑出血导致的神经功能缺损中起着重要作用。因此治疗脑出血可以从抑制炎症反应、减轻脑水肿、促进神经功能恢复方面入手。盐酸法舒地尔是一种具有广泛药理作用的新型药物,为 RHO 激酶抑制剂,具有拮抗炎性因子,保护神经抗凋亡,促进神经再生的作用。目前多项研究显示^[9-10],法舒地

尔有助于改善脑缺血症状及伴随的神经元损伤。但其对于脑出血所致脑损伤的影响及相关机制未见报道。本研究观察法舒地尔在大鼠脑出血性损伤中是否具有保护作用,以及可能的作用机制。研究结果显示,在造模后第1天至第14天,模型组大鼠的 Longa 评分均显著的高于对照组,给予盐酸法舒地尔治疗后的大鼠 Longa 评分显著的降低,说明

法舒地尔可以降低神经缺陷评分,与其他研究结果相一致^[11]。有研究显示,经过法舒地尔治疗,慢性低灌注大鼠的认知功能损害有所减轻^[12]。本研究 Morris 水迷宫试验结果显示,治疗组大鼠在第 3 天至第 14 天逃避潜伏期低于模型组,且穿越平台次数也增高;结果表明法舒地尔干预大鼠学习认知损害显著减轻,提示 ROCK 抑制剂对 ICH 引起的认知功能损害有保护作用。机制可能与法舒地尔抑制 Rho 激酶,减少梗死容积,促进神经功能恢复有关^[13]。Sanjari 等研究发现^[14],Rho 激酶抑制剂可以显著抑制 IL-6、TNF- α 的分泌,其机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路、减少下游炎症因子有关。NF- κ B 信号通路参与炎症反应,NF- κ B 作为转录因子在免疫系统中起到关键作用。研究显示,ICH 后脑内 NF- κ B 表达上调,这可能与 ICH 的发病机制有一定关系^[15]。本研究也发现,模型组大鼠的血清 IL-6、TNF- α 、NF- κ B 增高,给予法舒地尔治疗后大鼠血清 IL-6、TNF- α 、NF- κ B 降低;表明盐酸法舒地尔治疗 ICH 大鼠能降低 IL-6、TNF- α 、NF- κ B 的表达水平,说明舒地尔治疗 ICH 大鼠可以抑制炎症因子释放,从而减少对神经细胞的损伤。

综上所述,盐酸法舒地尔治疗 ICH 大鼠能显著的改善大鼠神经及认知功能、降低脑出血后大鼠的炎症反应程度,具有一定的临床推广价值,但具体的作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 官念,吴碧华,刘黎明,等.脑出血病因及相关机制的研究进展[J].中华老年心脑血管病杂志,2016,18(6):670-2.
- [2] 陈普建,余蓓蓓,朱蔚骏.早期强化降压治疗对脑出血患者血肿扩大、神经功能及血浆 vWF、NF- κ B 水平的影响[J].医学临床研究,2017,34(1):144-6.
- [3] 蒋小群,刘鸣,游潮.脑出血病因与部位关系的研究进展[J].当代医学,2016,29(4):11-2.
- [4] 叶红伟,方婷婷,谷小雨,等. Rho 激酶和自噬在法舒地尔抗心肌缺血/再灌注损伤中的作用[J].南方医科大学学报,2016,36(12):1706-11.
- [5] 康纪峰,黄清,刘运海.自发性脑出血遗传学病因的研究进展[J].中华医学遗传学杂志,2016,33(5):702-7.
- [6] QIU M, SATO S, ZHENG D, et al. Admission heart rate predicts poor outcomes in acute intracerebral hemorrhage: the intensive blood pressure reduction in acute cerebral hemorrhage trial studies [J]. Stroke, 2016, 47(6):1479-85.
- [7] LI Q, ZHANG G, XIONG X, et al. Black hole sign: novel imaging marker that predicts hematoma growth in patients with intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2016, 47(7):1777-81.
- [8] ZHENG H, CHEN C, ZHANG J, et al. Mechanism and therapy of brain edema after intracerebral hemorrhage [J]. Cerebrovasc Dis, 2016, 42(3-4):155-69.
- [9] 王艮卫,吴楠,牛光明,等.法舒地尔联合尼莫地平治疗蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的临床研究[J].中国临床药理学杂志,2016,32(11):963-5.
- [10] 吴春芳,沈晓明,乔利军.盐酸法舒地尔注射液对急性脑梗死患者血清血管内皮生长因子、血管生长素-1 浓度的影响[J].中国老年学杂志,2017,37(11):123-5.
- [11] 孙林林,刘振刚,张志勇,等.盐酸法舒地尔对蛛网膜下腔出血大鼠学习记忆功能及海马 CA1 区自噬的影响[J].中国康复理论与实践,2017,23(3):257-62.
- [12] 程建杰,杨锡彤,杜小珊,等.法舒地尔对小鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的血脑屏障机制[J].中华行为医学与脑科学杂志,2017,26(10):933-7.
- [13] GAO H, HOU F, DONG R, et al. Rho-Kinase inhibitor fasudil suppresses high glucose-induced H9c2 cell apoptosis through activation of autophagy[J]. Cardiovasc Ther, 2016, 34(5):352-9.
- [14] SANJARI N, PAKRAVAN M, NOURINIA R, et al. Intravitreal injection of a Rho-kinase inhibitor (fasudil) for recent onset non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy [J]. J Clin Pharmacol, 2016, 56(6):749-53.
- [15] HE Q, LI YH, GUO SS, et al. Inhibition of Rho-kinase by Fasudil protects dopamine neurons and attenuates inflammatory response in intranasal LPS-mediated Parkinson's model[J]. Eur J Neurosci, 2016, 43(1):41-52.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第 482 页)

- [7] 刘爱国,李国明,高玉红,等.冠心病患者冠状动脉狭窄程度与心肌缺血总负荷的关系[J].山东医药,2018,58(22):48-50.
- [8] 朱黎,赵新湘,孙林,等. MR 心肌首过灌注成像评估肥厚型心肌病心肌缺血[J].中国医学影像技术,2018,34(2):214-8.
- [9] 中华医学会超声医学分会超声心动图学组.负荷超声心动图规范化操作指南[J].中国医学影像技术,2017,33(4):632-8.
- [10] 王洁,陈宏伟,方向明,等.双源 CT 冠状动脉及心肌灌注一站式成像对冠心病的诊断价值[J].中华放射学杂志,2017,51(4):251-6.
- [11] GEORGE RT, ARBAB-ZADEH A, MILLER JM, et al. Computed tomography myocardial perfusion imaging with 320-row detector computed tomography accurately detects myocardial ischemia in patients with obstructive coronary artery disease[J]. Circ Cardiovasc Imaging, 2012,5(3):333-40.
- [12] 董小波,王颖,于秀艳,等.动态心电图和 CT 首过心肌灌注成像在冠心病心肌缺血诊断中的对比分析[J].中国医药导报,2017,14(7):110-3.
- [13] 张丽环,张强,叶伟祥.冠心病心肌缺血发作诊断中动态心电图 QTc 间期的预测价值[J].基因组学与应用生物学,2017,13(2):511-5.
- [14] 蔡湘怡,李红林,管雪琴,等.冠状动脉 CTA 联合 CT 心肌灌注成像诊断冠心病:Meta 分析[J].中国医学影像技术,2017,33(9):1344-8.
- [15] 牛卢芳.可疑冠心病患者动态心电图研究:QTc 间期对心肌缺血的诊断及预测价值[D].广州:汕头大学,2012.

(本文编辑:蒋湘莲)