

·实验研究·

利鲁唑对大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的保护作用

王 涛, 张馨娜, 赵大鹏, 赵芳芳, 张文汇, 刘运林

【摘要】目的 研究利鲁唑对蛛网膜下腔出血 (SAH) 大鼠早期脑损伤的保护作用。方法 91 只大鼠分为假手术组 24 只、安慰剂组 34 只和治疗组 33 只。假手术组仅切断颈外动脉并结扎;安慰剂组和治疗组建立大鼠颈内动脉穿刺 SAH 模型,治疗组术后 2 h 经腹腔注射 0.5 ml 利鲁唑 (6 mg/kg),安慰剂组注射等量生理盐水。采用改良 Garcia 评分系统评估大鼠神经功能,伊文思蓝渗出法评估血-脑脊液屏障通透性,干湿重法测定脑含水量,Western 印迹法及免疫荧光染色检测皮质谷氨酸转运体 1 (GLT-1) 表达,试剂盒测定脑脊液谷氨酸含量及皮质中丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽水平,TUNEL 法检测神经元凋亡。结果 与安慰剂组比较,治疗组大鼠 SAH 后神经功能评分显著提高 ($P < 0.05$),伊文思蓝含量、脑含水量、脑脊液中高浓度谷氨酸及皮质中 MDA 含量均明显降低 ($P < 0.05$),皮质中 GLT-1 表达及还原型谷胱甘肽水平显著升高 ($P < 0.05$),TUNEL/NeuN 复染阳性细胞显著减少 ($P < 0.05$)。结论 利鲁唑可减轻 SAH 后早期脑损伤,其机制可能与抗谷氨酸兴奋性和抑制神经元凋亡有关。

【关键词】蛛网膜下腔出血; 利鲁唑; 神经保护; 脑损伤; 大鼠

中图分类号: R-332

文献标志码: A

doi: 10.11850/j.issn.1009-122X.2019.09.010

Neuroprotective effect of riluzole against early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats

Wang Tao, Zhang Xinna, Zhao Dapeng, Zhao Fangfang, Zhang Wenhui, Liu Yunlin

Department of Neurology, Tai'an City Central Hospital, Tai'an, Shandong 271000, China

Abstract: Objective To study the protective effect of riluzole against early brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** Ninety-one rats were randomly divided into the sham group with 24 rats, the placebo group with 34 and the treatment group with 33. External carotid artery was cut and ligated in the sham group, SAH models of internal carotid artery puncture were established in the placebo group and treatment group. Riluzole (0.5 ml) was used via intraperitoneal injection 2 h after surgery in the treatment group and saline (0.5 ml) in the placebo group. The neurological function was assessed by modified Garcia score. The permeability of blood brain barrier (BBB) was assessed by Evans blue extravasation method. The brain water content was determined by the wet-dry method. Glial glutamate transporter 1 (GLT-1) expression was detected by Western blotting and immunofluorescence. The glutamate level in the cerebrospinal fluid (CSF) and malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in the cortex were measured with Kit, and the neuronal apoptosis was detected by TUNEL staining. **Results** Compared with the placebo group, the neurological function was significantly improved ($P < 0.05$), the Evens blue content, brain water content, glutamate in the CSF and MDA expression in the cortex reduced obviously, GLT-1 and GSH content in the cortex significantly increased ($P < 0.05$), and the positive cell of TUNEL/NeuN counterstaining decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Riluzole can alleviate early brain injury after SAH, and the potential mechanism may relate with anti-glutamate and anti-apoptosis effects.

Key words: subarachnoid hemorrhage; riluzole; neuroprotection; brain injuries; rats

蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 后早期脑损伤是不良预后的最重要病理生理机制,包括颅内压、脑灌注压改变及脑血流量减少,从而继发兴奋损伤、氧化应激、炎症反应、细胞凋亡和脑水肿^[1]。兴奋损伤在 SAH 后神经细胞死亡中起主导作用。脑脊液中的谷氨酸浓度在 SAH 后显著升高^[2-3],导致兴奋损伤诱导钙超载和继发细胞凋亡^[4]。利鲁唑可通过抑制谷氨酸释放和促进再摄取,抑制谷氨酸的神经传递,起到抗谷氨酸作用^[5]。本研究观察利鲁唑对大鼠 SAH 后早期脑损伤后谷氨酸

兴奋性、氧化应激和神经元凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与分组 雄性 SD 大鼠 (由山东大学动物中心提供),利鲁唑、伊文思蓝、抗兔 IgG-FITC、抗小鼠 IgG-TRITC 抗体 (Sigma, 美国);谷氨酸测定试剂盒 (BioVision, 美国);Bradford protein Assay Kit、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和谷胱甘肽试剂盒 (碧云天, 上海);谷氨酸转运体 1 (glial glutamate transporter, GLT-1) 抗体 (Abcam, 美国);NeuN 抗体 (Millipore, 美国);活性 caspase-3 抗体 (Cell Signaling Technology, 美国);TUNEL 试剂盒

作者单位: 271000 泰安市中心医院神经内科

(Roche, 德国)。

91 只大鼠分入 3 组:假手术组 24 只,SAH 模型安慰剂对照组(安慰剂组)34 例,SAH 模型利鲁唑治疗组(治疗组)33 例。实验动物术前适应环境 1 周,恒湿(55%~60%)、恒温(23℃~25℃)和 12-12 h 光/暗周期。每组用于神经功能评分和伊文思蓝试验 6 只,检测脑含水量 6 只,抽取脑脊液后取脑行 Western-blot 和生化实验 6 只,冷冻切片免疫荧光染色 6 只。其中安慰剂组和治疗组大鼠在取材时间点之前死亡,分别补充 10 只和 9 只。

1.2 方法

1.2.1 大鼠颈内动脉穿刺 SAH 模型制作、给药和评估:大鼠颈内动脉穿刺 SAH 模型和 SAH 分级基于前期研究^[6-7]。麻醉大鼠,仰卧位固定,取颈部正中纵切口。安慰剂组、治疗组大鼠暴露并游离其左侧颈外动脉,由近心端送入 4-0 单丝尼龙线插入颈内动脉,穿破大脑前、中动脉分叉部,然后退出线栓,恢复颈总动脉及颈内动脉血流灌注;术后 2 h 给药。假手术组大鼠仅分离动脉、阻断血流、结扎切断颈外动脉,不进行血管内插线操作。

给药方法:术后 2 h 给予安慰剂组大鼠生理盐水 0.5 ml 腹腔注射,治疗组给予利鲁唑(用生理盐水配制成 4 mg/ml 溶液)0.5 ml 腹腔注射,2 次/d。利鲁唑治疗剂量和时间是基于脊髓损伤模型的前期研究^[8]。在 SAH 后 72 h 神经系统功能评估后,处死所有大鼠。

模型评估:SAH 严重程度根据取材大鼠脑图片量化评估,按照基底池等 6 个部分出血量判断^[6,9]。每个部分评分 0~3 级:0 级无 SAH;1 级很少量 SAH;2 级可见动脉血管上附着中等量血液;3 级血凝块覆盖所有可见动脉。总分 0~18 分累计。

1.2.2 神经功能评分:每组取 6 只测定神经功能评分,剔除取材时间点之前死亡的动物评分。在 SAH 后 24、48、72 h 使用改良 Garcia 评分系统^[9]进行神经功能评定,包含 6 项测试:自发活动、攀爬、前爪伸出、四肢对称运动、震动觉反应以及对胡须刺激的反应。神经功能评分由两名“单盲”调查员进行 6 项测试评定,而且测试顺序随机安排。较高评分提示较好的测试表现。

1.2.3 血-脑脊液屏障通透性和脑含水量测定:
①将 6 只完成 72 h 神经功能评分后大鼠注射伊文思蓝,应用伊文思蓝渗透法检测血-脑脊液屏障通透性^[10]。将伊文思蓝染料注入股静脉,循环 1 h,麻醉大鼠,PBS 缓冲液左心室灌注快速取脑并分离左右半球。取左侧半球皮质区称重并在 PBS 缓冲液中匀

浆,与等体积三氯乙酸和乙醇混合液(1:3)共孵育 12 h。样品上清液和标准品采用酶标仪比色法测量 610 nm 吸收峰。每组伊文思蓝含量均按标准曲线计算。
②每组取 6 只测定脑含水量。使用干湿重法测定脑组织含水量:脑含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。分离左右半球,左侧半球皮质称重得到湿重,80℃恒温干燥 72 h 以获得干重。

1.2.4 脑脊液中谷氨酸浓度、皮质中 MDA 和谷胱甘肽测定及 Western-blot 检测: 每组取 6 只大鼠穿刺囊枕膜抽取脑脊液(行谷氨酸浓度测定),然后取脑行 Western-blot 检测及 MDA、谷胱甘肽测定。

①谷氨酸浓度测定:SAH 后 72 h,麻醉大鼠以立体定向仪头架固定,切皮暴露囊枕膜,使用一次性 1 ml 注射器穿刺枕大池获取 50 μl 脑脊液,与 100 μl 谷氨酸测定缓冲液混合,取 100 μl 上清液使用谷氨酸测定试剂盒测定谷氨酸浓度(mmol/L)。
②Western-blot 分析:分离左侧半球皮质,通过 RIPA lysis 缓冲液匀浆,确定蛋白浓度。包含 50 μg 蛋白质的上清液经 SDS-PAGE 电泳转移到硝化纤维素膜上。脱脂牛奶封闭硝化纤维素膜,GLT-1 抗体(1:1000)或活性 caspase-3 抗体(1:1000)共孵育。再与抗兔 IgG 辣根过氧化物标记抗体(1:3000)共孵育,化学发光试剂盒将消化纤维素膜显影并置于 ChemiDoc MP system (Bio-Rad) 成像。
③MDA 和谷胱甘肽含量测定:将左侧大脑半球皮质区在生理盐水中匀浆并离心获取上清液。试剂盒测定蛋白质浓度。取 100 μl 上清液用 MDA assay kit 和 GSH assay kit (碧云天,上海)测定 MDA 与谷胱甘肽含量。

1.2.5 免疫荧光法和 TUNEL 染色: 每组取 6 只大鼠,SAH 后 72 h,根据前期研究行免疫荧光和 TUNEL 染色^[6]。大鼠麻醉,PBS 缓冲液、4%多聚甲醛 PBS 溶液依次进行左心室灌注,快速取脑并以 OCT 包埋剂包埋。冷冻切片机获取脑冠状位切片,0.5% Triton X-100 处理,5%山羊血清封闭。切片与 GLT-1 抗体(1:100)或 NeuN 抗体(1:100)一起孵育,然后与抗兔 IgG-FITC(1:200)或抗小鼠 IgG-TRITC 抗体(1:200)共孵育。TUNEL 染色步骤:脑冠状位切片与 NeuN 染色剂一起孵育,均使用 TUNEL 试剂盒检测细胞凋亡。使用荧光显微镜(Olympus,日本)常规参数,对每组 6 只大鼠的皮质区各拍摄 3 个显微镜视野(20×)图像,分别选择 1 张计数 GLT-1 或 TUNEL/NeuN 阳性细胞。从每组的 6 幅图中计算出 GLT-1 或 TUNEL/NeuN 阳性细胞的数目。

1.3 统计分析 使用 GraphPad 软件分析数据,数

据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用单因素方差分析 Bonferroni 校正检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果 (表 1; 图 1~3)

2.1 SAH 后的神经功能缺损评分 假手术组大鼠无死亡,安慰剂组死亡 10 只,治疗组死亡 9 只。安慰剂组与治疗组之间 SAH 分级无显著差异 ($P > 0.05$; 图 1)。SAH 后 24、48、72 h,改良 Garcia 评分法提示:安慰剂组平均神经功能评分显著低于假手术组 ($P < 0.05$),而治疗组得分较安慰剂组升高,且差异具有显著性 ($P < 0.05$)。上述结果说明:利鲁唑可

表 1 3 组大鼠各项检测指标对比 ($\bar{x} \pm s$)

项目	假手术组	安慰剂组	治疗组
SAH 评分 (分)	0	12.5 \pm 1.0	12.3 \pm 1.1 ^①
神经功能评分 (分)			
24 h	17.3 \pm 0.8 ^②	11.0 \pm 0.5	12.5 \pm 0.7 ^②
48 h	17.0 \pm 0.6 ^②	12.0 \pm 0.4	13.4 \pm 0.6 ^②
72 h	17.5 \pm 0.9 ^②	12.5 \pm 0.6	14.0 \pm 0.5 ^②
伊文思蓝含量 (mg/g)	4.0 \pm 1.1 ^②	38.0 \pm 5.5	19.1 \pm 3.4 ^②
脑含水量 (%)	79.0 \pm 0.2 ^②	80.5 \pm 0.2	79.7 \pm 0.3 ^②
脑脊液谷氨酸浓度 (mmol/L)	2.3 \pm 0.4 ^②	47.0 \pm 6.1	25.1 \pm 4.6 ^②
GLT-1 表达	1.0 \pm 0.11 ^②	0.42 \pm 0.07	0.84 \pm 0.09 ^②
GLT-1 染色阳性细胞 (个)	50 \pm 10 ^②	25 \pm 5	42 \pm 7 ^②
MDA 含量 (nmol/L)	19.0 \pm 3.1 ^②	53.1 \pm 6.9	31.5 \pm 4.6 ^②
还原型谷胱甘肽 (nmol/L)	1.90 \pm 0.15 ^②	1.10 \pm 0.12	1.63 \pm 0.14 ^②
TUNEL/NeuN 复染阳性细胞 (个)	3 \pm 2 ^②	30 \pm 5	17 \pm 4 ^②
激活的 caspase-3 表达	1.0 \pm 0.09 ^②	1.73 \pm 0.15	1.31 \pm 0.09 ^②

注:①与安慰剂组比较, $P > 0.05$; ②与安慰剂组比较, $P < 0.05$

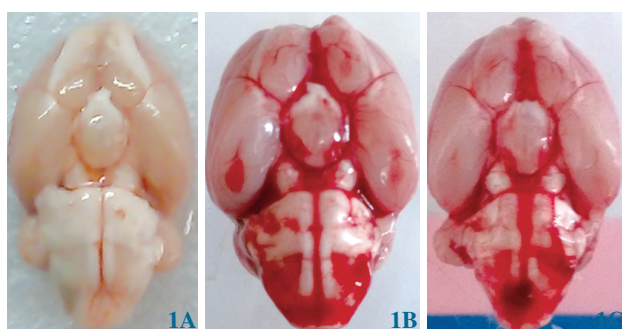


图 1 各组大鼠 SAH 后 72 h 严重程度 1A 假手术组 1B 安慰剂组 1C 治疗组

改善大鼠 SAH 后神经功能缺损。

2.2 血-脑脊液屏障通透性、脑含水量检测 SAH 后 72 h 安慰剂组脑组织中的伊文思蓝含量和脑含水量均较假手术组升高,而治疗组伊文思蓝含量和脑含水量与安慰剂组相比显著下降 ($P < 0.05$)。上述结果说明:利鲁唑可降低 SAH 引起的血-脑脊液屏障通透性及脑水肿。

2.3 SAH 后脑脊液谷氨酸浓度和 GLT-1 表达 SAH 后 72 h,安慰剂组脑脊液谷氨酸浓度较假手术组升高,而治疗组较安慰剂组显著下降 ($P < 0.05$)。GLT-1 是功能性谷氨酸转运体的主要成员,Western-blot 分析提示:SAH 后 72 h 安慰剂组 GLT-1 蛋白表达较假手术组减少,而治疗组与安慰剂组相比上调 GLT-1 表达 ($P < 0.05$; 图 2)。同时,以假手术组为参照,安慰剂组 GLT-1 阳性皮质细胞明显减少,而治疗组较安慰剂组显著增加 ($P < 0.05$; 图 3)。以上结果提示:利鲁唑可能通过上调 SAH 后 GLT-1 表达降低脑脊液中的谷氨酸水平。

2.4 SAH 后 MDA 含量、还原型谷胱甘肽水平 与假手术组相比,安慰剂组 SAH 后 72 h MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$),还原型谷胱甘肽含量显著下降 ($P < 0.05$);与安慰剂组比较,治疗组 SAH 后 72 h MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$),还原型谷胱甘肽含量显著升高 ($P < 0.05$)。以上结果提示:利鲁唑可显著减少 SAH 诱导的 MDA 生成;还原型谷胱甘肽也在利鲁唑治疗后得以改善。

2.5 SAH 后的神经元凋亡 在 SAH 后 72 h,皮质神经元凋亡通过免疫荧光染色切片 NeuN (一种神

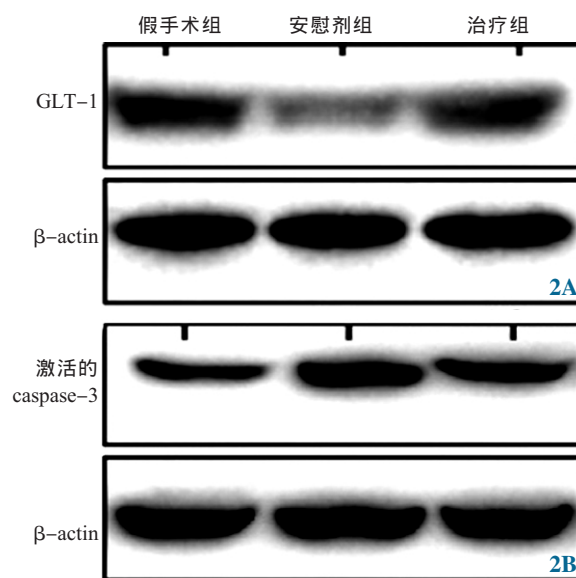


图 2 Western blot 检测 SAH 后 72 h 大鼠脑组织蛋白表达 2A GLT-1 表达 2B 激活的 Caspase-3 表达

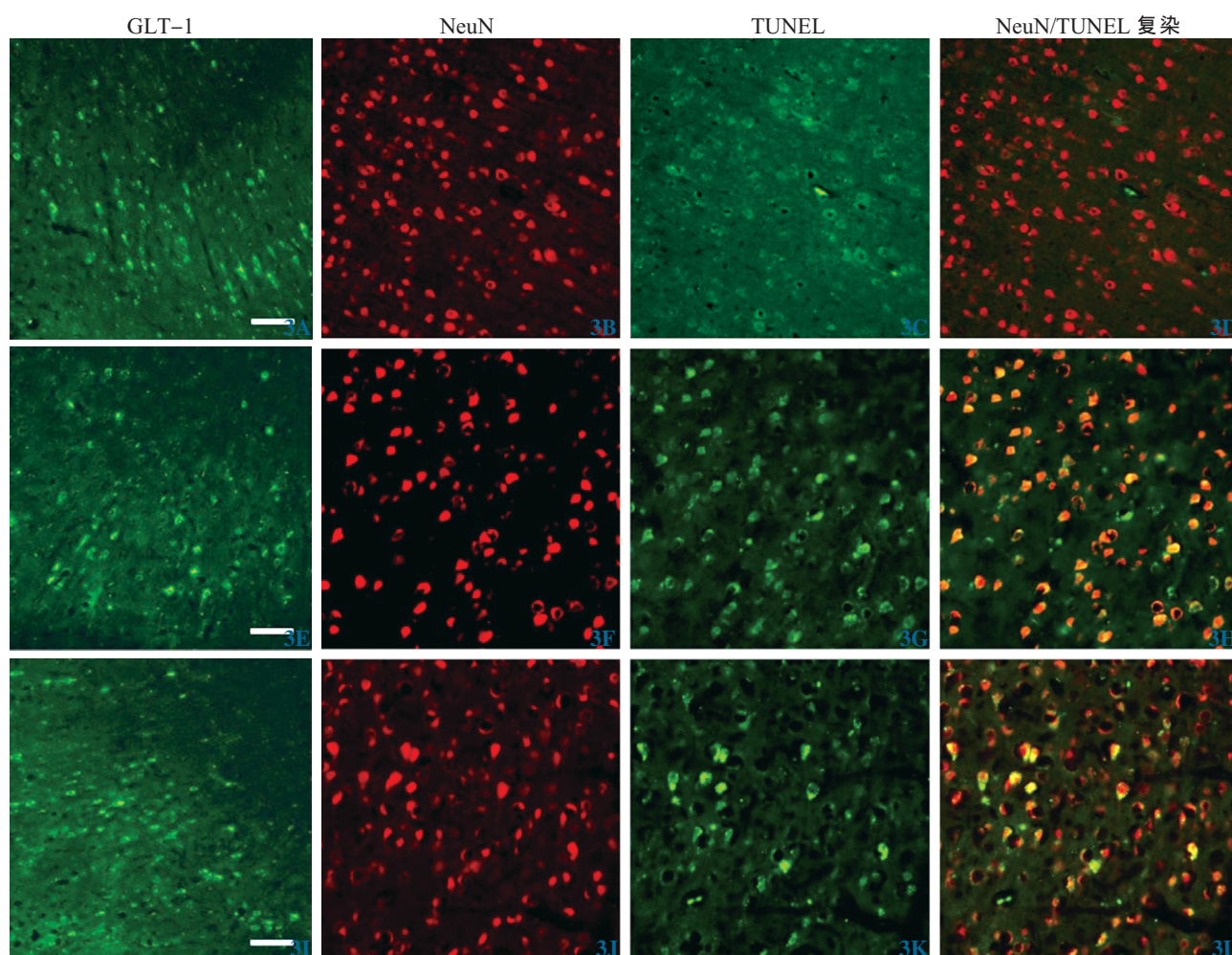


图3 各组大鼠 SAH 后 72 h 脑组织中 GLT-1 表达与 TUNEL、NeuN 蛋白表达 (免疫荧光染色 $\times 200$) 3A~3D 假手术组 3E~3H 安慰剂组 3I~3L 治疗组

经标记物) 和 TUNEL 染色来判定。与假手术组相比,安慰剂组在 SAH 后 TUNEL/NeuN 阳性细胞显著增加,而治疗组 TUNEL/NeuN 阳性细胞计数显著下调 ($P < 0.05$; 图 3)。另外, Western-blot 分析显示:安慰剂组激活的 Caspase-3 表达较假手术组显著升高 ($P < 0.05$),而治疗组较安慰剂组显著下降 ($P < 0.05$; 图 2)。以上结果说明利鲁唑治疗能够减轻 SAH 后的神经元凋亡。

3 讨论

3.1 对神经功能缺损的影响 神经功能缺损是早期脑损伤的常见和重要特征,是评价 SAH 预后的重要指标。文献证据表明:SAH 后血-脑脊液屏障破坏发生很早,并且促使血清浸润脑实质,导致脑水肿和神经炎症反应^[1]。降低脑脊液中谷氨酸浓度和抑制氧化应激反应可以减轻 SAH 后血-脑脊液屏障破坏^[12]。本组研究表明:利鲁唑可改善 SAH 后大鼠神经功能缺损,这与之前的缺血性卒中研究结论

一致^[13]。

3.2 对氧化应激的影响 氧化应激会导致 DNA 损伤、脂质过氧化和蛋白质分解,并参与血-脑脊液屏障破坏和神经炎症反应过程^[14]。利鲁唑显著降低脑脊液的谷氨酸浓度,降低脂质氧化损伤标记物 MDA 的含量。本组推测利鲁唑可能通过抑制谷氨酸的神经毒性和氧化应激的发生,从而防止 SAH 诱导的血-脑脊液屏障破坏。

3.3 利鲁唑的神经保护作用机制 利鲁唑是一种非灭活电压依赖性钠通道抑制剂,可通过抑制谷氨酸释放和增加谷氨酸摄取来拮抗谷氨酸的作用^[15]。在 SAH 后的脑脊液中过多的谷氨酸是导致神经毒性的病理生理过程^[16]。脑内离子分布和离子通道表达迅速并且严重受损, Na^+ 通过电压门控 Na^+ 通道进入是导致 SAH 后轴突损伤的关键步骤^[1]。本组研究表明:利鲁唑能够抑制 SAH 后大鼠脑皮质的 TUNEL/NeuN 阳性细胞数上升,提示利鲁唑可通过抗凋亡作用对抗 SAH 诱导的早期脑损伤。推测利

鲁唑可以通过抑制 Na^+ 内流和谷氨酸释放,阻止 SAH 诱导的神经凋亡。

综上所述:本研究首次揭示利鲁唑对 SAH 大鼠早期脑损伤的影响。腹腔注射利鲁唑可显著改善 SAH 大鼠模型神经功能缺损症状,降低血-脑脊液屏障通透性和脑水肿,减少脑脊液中谷氨酸水平,增加皮质 GLT-1 表达和还原型谷胱甘肽含量,减少皮质 MDA 含量和神经元凋亡。应用利鲁唑可能通过拮抗谷氨酸和抗凋亡机制,对 SAH 大鼠提供神经保护。

【参 考 文 献】

- [1] CHEN S, FENG H, SHERCHAN P, et al. Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage [J]. Prog Neurobiol, 2014, 115: 64-91.
- [2] WU C T, WEN L L, WONG C S, et al. Temporal changes in glutamate, glutamate transporters, basilar arteries wall thickness, and neuronal variability in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage [J]. Anesth Analg, 2011, 112(3): 666-673.
- [3] ZHANG Z Y, JIANG M, FANG J, et al. Enhanced therapeutic potential of nano-curcumin against subarachnoid hemorrhage-induced blood-brain barrier disruption through inhibition of inflammatory response and oxidative stress [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(1): 1-14.
- [4] LAI T W, ZHANG S, WANG Y T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection [J]. Prog Neurobiol, 2014, 115: 157-188.
- [5] CHEAH B C, VUCIC S, KRISHNAN A V, et al. Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis [J]. Curr Med Chem, 2010, 17(18): 1942-1199.
- [6] ZHANG Z Y, SUN B L, LIU J K, et al. Activation of mGluR5 attenuates microglial activation and neuronal apoptosis in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Neurochem Res, 2015, 40(6): 1121-1132.
- [7] 闫聪,狄景龙,刘耀,等. imatinib 对大鼠 SAH 后早期脑损伤的影响 [J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2018, 23(10): 464-469.
- [8] WU Y, SATKUNENDRARAJAH K, TENG Y, et al. Delayed post-injury administration of riluzole is neuroprotective in a preclinical rodent model of cervical spinal cord injury [J]. J Neurotrauma, 2013, 30(6): 441-452.
- [9] SUGAWARA T, AYER R, JADHAV V, et al. A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model [J]. J Neurosci Methods, 2008, 167(2): 327-334.
- [10] ZHANG Z Y, YANG M F, WANG T, et al. Cysteamine alleviates early brain injury via reducing oxidative stress and apoptosis in a rat experimental subarachnoid hemorrhage model [J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(4): 543-553.
- [11] TSO M K, MACDONALD R L. Subarachnoid hemorrhage: a review of experimental studies on the microcirculation and the neurovascular unit [J]. Transl Stroke Res, 2014, 5(2): 174-189.
- [12] BOYKO M, MELAMED I, GRUENBAUM B F, et al. The effect of blood glutamate scavengers oxaloacetate and pyruvate on neurological outcome in a rat model of subarachnoid hemorrhage [J]. Neurotherapeutics, 2012, 9(3): 649-657.
- [13] VERMA S K, ARORA I, JAVED K, et al. Enhancement in the neuroprotective power of riluzole against cerebral ischemia using a brain targeted drug delivery vehicle [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(30): 19716-19723.
- [14] AYER R E, ZHANG J H. Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm [J]. Acta Neurochir Suppl, 2008, 104: 33-41.
- [15] NAGOSHI N, NAKASHIMA H, FEHLINGS M G. Riluzole as a neuroprotective drug for spinal cord injury: from bench to bedside [J]. Molecules, 2015, 20(5): 7775-7789.
- [16] JUNG C S, LANGE B, ZIMMERMANN M, et al. CSF and Serum Biomarkers Focusing on Cerebral Vasospasm and Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage [J]. Stroke Res Treat, 2013: 560305.

(收稿日期:2019-03-06; 修回日期:2019-04-01)

关于出示论文获基金资助及论文获奖证明的通知

凡2010 年以后投寄到我刊获得国家或部、省级以上各种基金资助的文稿,以及刊出文稿获得国家级或部、省级以上科学成果奖、科学技术进步奖的文稿,烦请将资助证明及获奖证明(复印件)寄至本部。本刊将根据资助及获奖等级给予一定的奖励,并赠送全年杂志。

本刊编辑部