

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.05.003

罗氟司特对大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤及神经炎症反应的影响*

吴庆建^{1,2} 李汉霞¹ 谢荣霞¹ 张宗勇¹ 杨明峰¹ 孙保亮^{1△}(¹ 泰山医学院脑科研究所,泰安 271000; ² 济宁医学院附属济宁市第一人民医院,济宁 272011)

摘要 目的 探讨罗氟司特对大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后早期脑损伤(early brain injury, EBI)及神经炎症反应的影响。方法 采用枕大池注血法建立 SAH 大鼠模型。将 36 只健康清洁级雄性 SD 大鼠随机分为:假手术组(Sham 组, n = 12)、模型组(SAH 组, n = 12) 罗氟司特治疗组(n = 12)。于 SAH 后 48h、72h, 各组大鼠行神经功能评分, 激光多普勒检测大鼠局部脑血流量(regional cerebral blood flow, rCBF), ELISA 法检测大鼠脑皮层及血液中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的含量。结果 SAH 后 48h、72h, 与 SAH 模型组相比, 罗氟司特治疗组大鼠神经功能评分显著降低, rCBF 显著升高, 各时间点大脑皮层及外周血液内炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的含量显著降低, 差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 罗氟司特可减轻 SAH 后 EBI, 其机制可能是减轻外周及中枢的神经炎症反应, 从而改善局部脑血流量。

关键词 蛛网膜下腔出血; 早期脑损伤; 罗氟司特; 神经炎症反应

中图分类号: R743.35 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)10-318-04

Effects of roflumilast on early brain injury and neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage in rats

WU Qingjian, LI Hanxia, XIE Rongxia, ZHANG Zongyong, YANG Mingfeng, SUN Baoliang

(¹ Institute for Neurological Diseases, Taishan Medical University, Taian 271000, China;² Jining No1. People's Hospital & the Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272011, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of roflumilast on early brain injury (EBI) and neuroinflammation after Subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats. **Methods** Subarachnoid hemorrhage mode was established by injection with autologous blood into cisterna magna. 36 male SPF SD rats were randomly divided into sham group, SAH group and roflumilast-treatment group. At 48 h and 72 h after SAH, nerve function score and regional cerebral blood flow (rCBF) were detected by laser Doppler, the IL-1 β , TNF- α and IL-6 content of peripheral blood were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** At 48 h and 72 h after SAH, compared with SAH model group, nerve function score of roflumilast treatment group descended significantly, and rCBF significantly increased. The content of IL-1 β , TNF- α and IL-6 in the cerebral cortex and peripheral blood at each time point decreased significantly, and all these differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Roflumilast reduced EBI after SAH, and the mechanism might be through reducing the peripheral blood and central nerve inflammatory reaction, which improved local cerebral blood flow.

Keywords: Subarachnoid hemorrhage; Early brain injury; Roflumilast; Nerve inflammatory reaction

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)具有高发病率和死亡率, 严重威胁人类健

康^[1]。早期脑损伤(early brain injury, EBI)发生在 SAH 后 72 h 内, 严重影响 SAH 患者预后, 国外学者研究认为 EBI 为 SAH 患者不良结局的主要因素^[2]。SAH 后 EBI 潜在的病理生理机制迄今仍未

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81471212)

△ [通信作者] 孙保亮, E-mail: blsun88@163.com

阐明,众多研究证实神经炎症在 SAH 后 EBI 发生和发展过程中扮演重要角色^[3-4]。既往研究发现,选择性磷酸二酯酶 3 (phosphodiesterase, PDE) 抑制剂西洛他唑可以改善 SAH 后临床结局^[5]。本文旨在探讨罗氟司特对 SAH 后 EBI 的保护作用及其作用机制,以期为临床用药提供基础实验理论。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠(8 周龄),体重 280 ~ 300g,由山东省动物实验中心提供(SCXK(京)2012-0001),所有的动物实验都遵照国家实验动物饲养和使用指标。罗氟司特购自上海麦克林生化科技有限公司(纯度 99%)。大鼠白细胞介素 1 β (IL-1 β) ELSA 检测试剂盒、大鼠 TNF- α ELISA 检测试剂盒、大鼠 IL-6 ELISA 检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。本实验所用其它化学试剂均为国产分析纯。

动物模型制作及分组:将 36 只健康清洁级雄性 SD 大鼠随机分为:假手术组(Sham 组)、模型对照组(SAH 组)、罗氟司特治疗组,每组 12 只,采用改良的枕大池一次注自体血法建立 SAH 大鼠模型^[6]。大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛(0.3ml/100g),俯卧位固定于立体定位仪上,取头颈部正中切口,充分暴露寰枕膜。翻转大鼠暴露右股动脉,经右股动脉抽取动脉血。操纵定位仪注射旋钮,将自体动脉血(0.1ml/100g)3min 内匀速向注入枕大池。待大鼠苏醒后,罗氟司特治疗组经腹腔注射罗氟司特(3mg/kg,1 次/d),SAH 组经腹腔注射溶媒(1ml 生理盐水 + 3% DMSO),Sham 不给予任何处理。

1.2 神经功能评分

SAH 术后 48h 和 72h,根据文献报道^[7]对各组大鼠行 3 种神经功能(饮食、行为和神经功能缺损)评分。行为学评分由两名对实验不知情的研究人员执行,且测试顺序是完全随机的,记录实验动物的食欲、活动和神经功能缺损情况,并根据评分标准给出评分。

1.3 rCBF 检测

SAH 术后 48h 和 72h,各组大鼠经腹腔麻醉成功后,固定于脑立体定位仪,取头部正中切口,充分暴露头骨,前囟后 2mm,中线左侧旁开 3mm,钻孔暴露硬脑膜,采用激光多普勒血流测量仪监测各组

大鼠 rCBF 值。

1.4 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 检测

于 SAH 后 48h 和 72h,过量麻醉大鼠,取静脉血 1ml,低温离心机(4 $^{\circ}$ C, 3000 r/min, 10 min)离心,取上清液保存备用。快速断头处死,取新鲜脑组织,快速称取颞叶皮层组织,1:10 (W:V) 加入 4 $^{\circ}$ C PBS,匀浆 30 s,匀浆后低温离心 10min(4 $^{\circ}$ C, 3000 r/min, 10min),离心完毕后取上清保存备用。取出所有检测标本,室温下复温,ELISA 法分别检测 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的含量。ELISA 检测操作严格按照试剂盒操作说明书步骤进行。

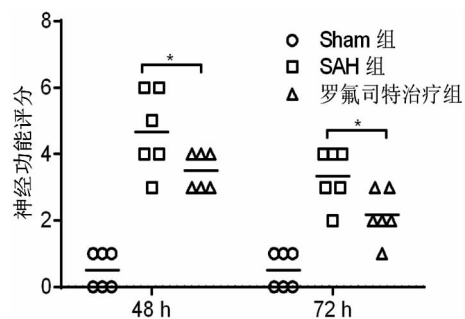
1.5 统计学方法

所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用 SPSS19.0 软件,组间均数比较采用重复测量方差分析,两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 定义为差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能评分结果

SAH 后 48、72h,与 Sham 组[48h: (0.5 $\pm$ 0.55)分;72h: (0.83 $\pm$ 0.41)分]相比,SAH 组[48h: (4.67 $\pm$ 1.21)分;72h: (0.33 $\pm$ 0.82)分]大鼠神经行为学评分得分明显升高,差异具有统计学意义($P_{\text{均}} < 0.05$)。统计分析表明,SAH 后 48、72h,与 SAH 组相比较,罗氟司特治疗组[48h: (3.5 $\pm$ 0.55)分;72h: (2.17 $\pm$ 0.75)分]改善了神经功能评分($P_{\text{均}} < 0.05$)。见图 1。



注:3 组间比较, $F_{\text{区间}} = 58.676, P < 0.05$;

与 SAH 组相比较, * $P < 0.05, n = 12$

图 1 各组大鼠神经功能评分

2.2 rCBF 检测结果

Sham 组大鼠 rCBF 相对稳定,SAH 组术后 rCBF 显著降低,SAH 后 48、72h 均低于 Sham 组,差异具有显著统计学意义($P < 0.05$)。SAH 后 48、72h,与 SAH 组相比较,罗氟司特治疗组 rCBF 显著

升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 rCBF 测定结果比较 ($n = 12$)

	48h	72h
Sham 组	1486.51 ± 56.83	1563.71 ± 48.76
SAH 组	779.63 ± 23.54 *	956.31 ± 34.28 *
罗氟司特治疗组	1249.69 ± 41.36 **	1387.67 ± 46.38 **
$F_{\text{区间}}$	1687.8	
P	< 0.05	

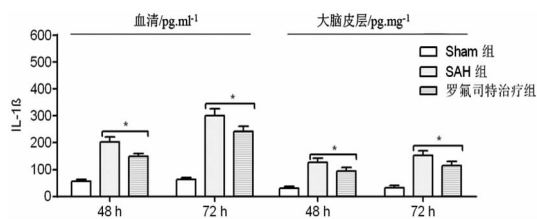
注:与 Sham 组相比, * $P < 0.05$;与 SAH 组相比, ** $P < 0.05$

2.3 血液中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的含量

Sham 组大鼠 48、72h 外周静脉血中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量呈低水平。SAH 后 48、72h,与 Sham 组相比较,SAH 组 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的含量显著升高,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。SAH 后 48、72h,与 SAH 组相比较,罗氟司特治疗组大鼠外周血中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的含量呈降低趋势,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 2~4。

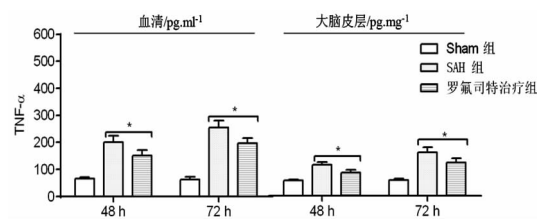
2.4 脑皮层中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的含量

SAH 后 48、72h,与 Sham 组相比较,SAH 组 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的含量显著升高,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。SAH 后 48、72h,与 SAH 组相比较,罗氟司特治疗组脑皮层中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的含量呈降低趋势,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 2~4。



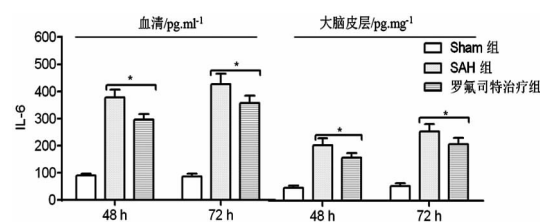
注:血液 $F_{\text{区间}} = 374.196, P < 0.05$, 脑皮层 $F_{\text{区间}} = 724.595, P < 0.05$;与 SAH 组相比, * $P < 0.05, n = 12$

图 2 大鼠外周血与大脑皮层中 IL-1 β 含量



注:血液 $F_{\text{区间}} = 544.397, P < 0.05$, 脑皮层 $F_{\text{区间}} = 447.772, P < 0.001$;与 SAH 组相比, * $P < 0.05, n = 12$

图 3 大鼠外周血与大脑皮层中 TNF- α 含量



注:血液 $F_{\text{区间}} = 1049.601, P < 0.05$, 脑皮层 $F_{\text{区间}} = 360.326, P < 0.05$;与 SAH 组相比, * $P < 0.05, n = 12$

图 4 大鼠外周血与大脑皮层中 IL-6 含量

3 讨论

大多数 SAH 发生由于动脉瘤破裂,大量红细胞溶血生成的氧合血红蛋白被释放了进入蛛网膜下腔。随后氧合血红蛋白诱发一系列应激反应,包括激活炎症反应和大量炎症细胞因子产生^[8]。国外学者研究发现,SAH 后促炎细胞因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)增加^[9],促炎细胞因子上调的潜在机制涉及核的激活 NF- κ B、有丝分裂原蛋白激酶通路的激活和 toll 样受体 4 (TLR4) 信号通路^[10-11]。SAH 后大量炎症因子的产生最终导致脑水肿,血脑屏障通透性增加,氧化应激反应和神经元凋亡等一系列不良后果,是导致 SAH 后 EBI 的关键机制。本实验 SAH 后结果同样证实了,SAH 后 48h 和 72h 大鼠外周血及脑组织中促炎细胞因子(TNF- α 、IL-6 的 IL-1 β)含量增加,从而导致神经功能的恶化。既往研究提示控制 SAH 后炎症反应可以有效改善 EBI。

罗氟司特是高度选择性 PDE-4 抑制剂,已通过美国食品和药物管理局认证,作为抗炎药物用于严重的慢性阻塞性肺疾病和慢性支气管炎^[12]。除作用于呼吸系统以外,神经科学工作者研究发现,其可以有效改善高血压导致的学习记忆损害^[13],降低啮齿类动物的认知功能障碍^[14]。在炎症扮演重要角色的神经系统疾病中,如脊髓损伤^[15],脑创伤^[16]及缺血性脑卒中^[17],抑制 PDE-4 可以带来益处。本实验假设罗氟司特可以降低促炎因子,从而降低 SAH 后 EBI。研究结果发现,罗氟司特可以有效降低外周血液及脑内促炎因子的表达,升高 SAH 后 rCBF,从而促进 SAH 后 EBI 的恢复。上述研究结果揭示罗氟司特可以通过抑制 SAH 后 EBI 发生过程中的炎症反应,从而发挥脑保护作用。

综上,罗氟司特可以显著降低 SAH 后外周及中枢的促炎因子,改善 SAH 后 rCBF,从而有效降

低了 SAH 后 EBI,其详细作用机制及相关信号转导通路有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage[J]. Lancet, 2007, 369(9558): 306-318. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60153-6.
- [2] Sehba FA, Pluta RM, Zhang JH. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury[J]. Mol Neurobiol, 2011, 43(1): 27-40. DOI: 10.1007/s12035-010-8155-z.
- [3] Sozen T, Tsuchiyama R, Hasegawa Y, et al. Role of interleukin-1 β in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice[J]. Stroke, 2009, 40(7): 2519-2525. DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.549592.
- [4] Erahin M, Toklu HZ, Erzik C, et al. The anti-inflammatory and neuroprotective effects of ghrelin in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats[J]. J Neurotrauma, 2010, 27(6): 1143-1155. DOI: 10.1089/neu.2009.1210.
- [5] Matsuda N, Naraoka M, Ohkuma H, et al. Effect of cilostazol on cerebral vasospasm and outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Cerebrovasc Dis, 2016, 42(1-2): 97-105. DOI: 10.1159/000445509.
- [6] 吴庆建, 孙树印, 宋大庆, 等. 降钙素基因相关肽对蛛网膜下腔出血模型大鼠脑血管痉挛的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2015, 24(6): 489-492. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2015.06.003.
- [7] Zhang ZY, Sun BL, Yang MF, et al. Carnosine attenuates early brain injury through its antioxidative and anti-apoptotic effects in a rat experimental subarachnoid hemorrhage model[J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(2): 147-157. DOI: 10.1007/s10571-014-0106-1.
- [8] Zoerle T, Ilodigwe D, Wan H, et al. Pharmacologic reduction of angiographic vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage: systematic review[J]. Acta Neurochir Suppl, 2013, 115: 247-251. DOI: 10.1007/978-3-7091-1192-5_44.
- [9] Maddahi A, Povlsen GK, Edvinsson L. Regulation of enhanced cerebrovascular expression of proinflammatory mediators in experimental subarachnoid hemorrhage via the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular

signal-regulated kinase pathway[J]. J Neuroinflammation, 2012, 9: 274. DOI: 10.1186/1742-2094-9-274.

- [10] You WC, Wang CX, Pan YX, et al. Activation of nuclear factor- κ B in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage and its potential role in delayed brain injury[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e60290. DOI: 10.1371/journal.pone.0060290.
- [11] Wang Z, Wu L, You W, et al. Melatonin alleviates secondary brain damage and neurobehavioral dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage: possible involvement of TLR4-mediated inflammatory pathway[J]. J Pineal Res, 2013, 55(4): 399-408. DOI: 10.1111/jpi.12087.
- [12] Chervinsky P, Meltzer EO, Busse W, et al. Roflumilast for asthma: Safety findings from a pooled analysis of ten clinical studies[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2015, 35(Suppl): S28-S34. DOI: 10.1016/j.pupt.2015.11.003.
- [13] Jabaris SG, Sumathy H, Kumar RS, et al. Effects of rolipram and roflumilast, phosphodiesterase-4 inhibitors, on hypertension-induced defects in memory function in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 746: 138-147. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.10.039.
- [14] Vanmierlo T, Creemers P, Akkerman S, et al. The PDE4 inhibitor roflumilast improves memory in rodents at non-emetic doses[J]. Behav Brain Res, 2016, 303: 26-33. DOI: 10.1016/j.bbr.2016.01.031.
- [15] Schaal SM, Garg MS, Ghosh M, et al. The therapeutic profile of rolipram, PDE target and mechanism of action as a neuroprotectant following spinal cord injury[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e43634. DOI: 10.1371/journal.pone.0043634.
- [16] Atkins CM, Oliva AA Jr, Alonso OF, et al. Modulation of the cAMP signaling pathway after traumatic brain injury[J]. Exp Neurol, 2007, 208(1): 145-158. DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.08.011.
- [17] Hu S, Cao Q, Xu P, et al. Rolipram stimulates angiogenesis and attenuates neuronal apoptosis through the cAMP/cAMP-responsive element binding protein pathway following ischemic stroke in rats[J]. Exp Ther Med, 2016, 11(3): 1005-1010. DOI: 10.3892/etm.2015.2958.

(收稿日期 2017-06-26)

(本文编辑:石俊强)