

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.006

褪黑素对蛛网膜下腔出血后继发性脑损伤及认知功能的影响及其机制研究*

吴凌云 王中[△] 陈罡 季骋远 王伟

(苏州大学附属第一医院神经外科 江苏 苏州 215006)

摘要 目的:探讨褪黑素对蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后神经元细胞凋亡、坏死及继发性认知功能障碍的影响。**方法:**选择 80 只成年健康雄性 SD 大鼠,随机分为四组:正常组(n=20)、单纯 SAH 组(n=20)、SAH+ 安慰剂治疗组(n=20)和 SAH+ 褪黑素治疗组(n=20),经大鼠自体尾动脉(股动脉)非肝素化动脉血在 20 s 内注入视交叉池建立蛛网膜下腔出血模型,褪黑素注射剂量为 150 mg/kg,1 次/12 h,在蛛网膜下腔出血建模后 48h 处死各组部分大鼠,取血凝块周围的皮层脑组织(额颞底)做标本,通过 TUNEL 荧光染色及 Fluoro-Jade B 荧光染色测定神经元凋亡及坏死的情况,各组剩余大鼠在 SAH 后 48 小时开始通过 Morris 水迷宫试验测试其认知功能。**结果:**SAH 组大鼠的活动功能评分、Morris 水迷宫试验的逃避潜伏期及总路程、神经元细胞凋亡和坏死的百分比均较正常对照组大鼠显著升高 ($P<0.01$),而褪黑素治疗组以上指标均显著低于安慰剂治疗组 ($P<0.05$),但 SAH 组和安慰剂组之间以上指标比较均无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**褪黑素可能通过减少神经元细胞的凋亡和坏死改善蛛网膜下腔出血后大鼠的认知功能障碍。

关键词:蛛网膜下腔出血;褪黑素;脑损伤;Morris 水迷宫试验;认知功能

中图分类号:Q95-3;R743.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)15-2823-04

Research on the Effects and Mechanisms of Melatonin on the Secondary brain Damage and Neurobehavioral Dysfunction after Experimental Subarachnoid Hemorrhage*

WU Ling-yun, WANG Zhong[△], CHEN Gang, JI Cheng-yuan, WANG Wei

(Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu, 215006, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects and mechanisms of melatonin on the secondary brain damage and neurobehavioral dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods:** 80 adult SD rats were divided into four groups: control group (n=20), SAH group (n=20), SAH+vehicle group (n=20), and SAH+melatonin group (n=20). The rat SAH model was induced by injection of 0.3 ml fresh arterial, nonheparinized blood into the prechiasmatic cistern in 20 s. In SAH+melatonin group, melatonin was administered i.p. at 150 mg/kg at 0, 12, 24 and 36 hr after the induction of SAH. Part of rats in each group were killed on 48 hr after SAH. The brain sample was removed and kept in 10% formalin solution. Cognitive and memory changes were investigated in the Morris water maze at 48 hr after the induction of SAH with the rest of rats in each group. **Results:** The behavior and activity scores, escape latency and swimming distance in Morris water maze task, apoptosis and necrosis percentage of neurons of SAH rats were all significantly higher than those of the control rats ($P<0.01$), while the above index of SAH+melatonin group were significantly lower than those of the SAH+vehicle rats ($P<0.05$), but no significant difference was found in the above index between SAH and SAH+vehicle rats ($P>0.05$). **Conclusion:** Melatonin may improve the neurobehavioral dysfunction after SAH through decreasing the apoptosis and necrosis of neurons.

Key words: Subarachnoid hemorrhage; Melatonin; Brain injury; Morris water maze task; Cognitive function

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R743.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)15-2823-04

前言

蛛网膜下腔出血(SAH)是一种具有高发病率及死亡率的中枢神经系统疾病。近期研究表明,早期脑损伤(early brain injury, EBI)是导致患者蛛网膜下腔出血后 24-72 小时发病和死亡的主要

原因^[1]。在 SAH 或颅内动脉瘤手术后,绝大部分患者会出现注意力、记忆力及执行能力等认知功能的障碍^[2]。研究表明,褪黑素可通过激活 Nrf2-ARE 通路,提高 Nrf2 水平,上调 Nrf2-ARE 信号通路介导的下游多种产物发挥脑保护作用^[3]。但既往的研究着重于探讨褪黑素对 SAH 后大脑炎症应激反应的影响机

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81100872)

作者简介:吴凌云(1987-),男,硕士研究生,主要研究方向:脑血管领域,电话:18862106827, wly_1680@sina.com

△ 通讯作者:王中,电话:13306208761, E-mail:Dr.zhongwang@gmail.com

(收稿日期:2013-12-19 接受日期:2014-01-18)

制,而有关褪黑素与 SAH 后神经元细胞的凋亡及坏死,尤其是褪黑素对蛛网膜下腔出血后认知能力的影响,尚未见报道。本研究以 SD 大鼠的蛛网膜下腔出血模型为研究对象,通过 Morris 水迷宫的方法衡量 SAH 后大鼠的认知功能^[4],旨在探讨褪黑素对蛛网膜下腔出血后早期脑损伤及认知功能的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、设备及实验试剂

Morris 水迷宫自动监控仪(上海移数信息科技有限公司),TUNEL In Situ Cell Death fluorescein, 50 tests (ROCHE 公司产品),FLUORO-JADE™B(Millipore 公司产品)。

成年健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠由苏州大学医学院实验动物研究中心提供,体重 250~350 g,年龄 6~7 周,于室温 18~25 °C,自由饮食饮水,安静、避光环境中饲养。

1.2 蛛网膜下腔出血模型的建立

采用立体定向注射技术,构建视交叉前池注入动脉血 SAH 模型:10%水合氯醛溶液进行腹腔注射麻醉(0.35-0.4 ml/kg),在大鼠的颅骨前囟前方 7.5 mm 开骨窗,矢状面进针,方向与冠状面呈 45° 角进针,约 10~12 mm 至视交叉前池,在 20

秒内注入 0.3 mL 的非肝素化自体动脉血至视交叉前池^[5],骨蜡封闭骨窗,缝合手术切口,术中无菌操作。

1.3 动物分组

实验共计 80 只雄性 SD 大鼠,体重 250~350 g,应用随机数字表法,分为:正常组(n=20),单纯 SAH 组(n=20),SAH+ 安慰剂治疗组(n=20)和 SAH+ 褪黑素治疗组(n=20),共四组。

1.4 各组的处理方法

正常组不做任何处理,褪黑素治疗组给予褪黑素注射治疗,每次注射剂量为 150 mg/kg,在 SAH 建模后立即腹腔注射,随后在 12、24 及 36 h 分别腹腔注射,共注射 4 次。安慰剂组注射等容量溶剂,溶剂为 75%酒精及生理盐水混合液,于 SAH 建模成功后 48 h 再次麻醉大鼠,取血凝块周围皮层组织(颞底与颞底),以 10%福尔马林溶液固定保存。所有大鼠在视交叉前池注入自体动脉血后,会停止呼吸约 10 秒左右,经过心肺复苏后,建模 SD 大鼠的死亡率约为 31%。

1.5 神经行为活动的功能评分标准

蛛网膜下腔出血模型建立后第 47 h 分别评定大鼠的进食量、活动力和功能缺损三项行为活动。(如表 1)

1.6 Morris 水迷宫试验

Morris 水迷宫试验设备主体是一个内侧壁直径 2 m 和内

表 1 行为活动评分标准

Table 1 Standard of behavior and activity scores

| Category | Behavior | Score |
|----------|---|-------|
| Appetite | Finished meal | 0 |
| | Left meal unfinished | 1 |
| | Scarcely ate | 2 |
| Activity | Walk and reach at least three corners of the cage | 0 |
| | Walk with some stimulations | 1 |
| | Almost always lying down | 2 |
| Deficits | No deficits | 0 |
| | Unstable walk | 1 |
| | Impossible to walk | 2 |

侧壁高 0.75m 的圆形蓄水池。蓄水池中放入高约 0.4 m 的实验用自来水,水温控制在 32 °C 至 35 °C,让实验大鼠在水中体感舒适,水中加入高易溶性无毒的黑色食用染料,搅拌均匀,使得实验大鼠入水后,无法通过视觉发现测试平台。在视交叉 SAH 建模成功后第 48 小时开始进行 Morris 水迷宫实验。

实验分为定位航行实验和空间探索实验。(1)定位航行试验:在 SAH 后第二天开始,连续进行 4 天,每个大鼠每天进行 4 次,每次 60 秒。第一天,大鼠第一次意外发现隐藏的平台被排除在数据分析外,所以出现上述情况的大鼠,需多次参与实验。平台隐藏在西北象限的正中部,为了排除老鼠下水后与平台会产生的最短路程,大鼠在其他 7 个点(即除了西北点之外的东、南、西、北、东北、西南及东南)面朝池壁随机放入池中。记录大鼠在 60 秒内找到平台所需的时间(逃避潜伏期)及活动总路程。实验间隔时间为 10-20 秒(间隔时间是为了让大鼠尽快恢复体力,并且减轻实验带来的外在刺激)。(2)空间探索实验:在最后一次定位航行试验结束后的 24 小时(即 SAH 术后第 6

天),移走水池中的平台,将大鼠在原平台的对侧象限面朝池壁放入水中,记录其在 60 秒内每个象限花费的时间百分比及大鼠游过原平台位置的次数。所有行为测试在当天的 8 点到 18 点之间进行,所有老鼠完成当天实验后返回笼子休息,保持体毛干爽,并获得充足的水和食物^[6]。

1.7 TUNEL 荧光染色

(1)取 4-6 μm 的石蜡切片,经过二甲苯、无水乙醇及各梯度酒精脱蜡水化。(2)预处理:于温度为 37 °C 的避光保温箱中,切片于蛋白酶 K 溶液(10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 10 mMTris/HCl, pH 7.4-8)浸泡 30 min。(3)PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min。(4)在上述环境中,滴加 TUNEL 工作溶液,孵育 60 min。(5)PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min。(6)暗室中常温风干,滴加抗荧光淬灭封片剂,加盖玻片,激光显微镜拍照观察。

1.8 FLUORO-JADE B 荧光染色

(1)取 4-6 μm 的石蜡切片,经过二甲苯、无水乙醇及各梯度酒精脱蜡水化。(2)预处理:于暗室室温中,置入 0.06%的

KMnO₄ 溶液孵育 15 min。(3)PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。(4)滴加 Fluoro-Jade B 工作溶液(0.1% 乙酸溶剂)孵育 60 min。(5) PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min。(6)暗室中常温风干,滴加抗荧光淬灭封片剂,加盖玻片,激光显微镜拍照观察。

1.9 统计学分析

所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 进行统计分析,组间差异行单因素方差分析,两组间比较采用 SNK-q 检验,以 P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠行为活动功能评分的比较

正常组大鼠精神、食欲正常。单纯 SAH 组及安慰剂治疗组大鼠精神萎靡,毛发蓬乱斑驳,摄食减少,呈头低位蜷缩状,活动减少,部分可出现球结膜下出血。褪黑素治疗组大鼠精神及食欲较上述两组均明显改善,活动较多。SAH 组大鼠活动功能评分较正常组显著升高(P<0.01),褪黑素治疗组活动功能评分显著低于安慰剂治疗组(P<0.05),而 SAH 组和安慰剂组之间活动功能评分比较无统计学意义(P>0.05),如表 2。

表 3 各组大鼠第 2-5 天逃避潜伏期的比较(s)

Table 3 Comparison of the escape latency among different groups from the 2nd day to the 5th's(s)

| Group | Day 2 | Day 3 | Day 4 | Day 5 |
|---------------|------------|------------|------------|-------------|
| Control | 38.04± 3.8 | 28.35± 2.9 | 22.6± 2.5 | 17.35± 3.8 |
| SAH | 56.96± 3.9 | 54.68± 2.2 | 54.81± 3.7 | 49.4± 4.9* |
| SAH+vehicle | 56.87± 2.2 | 55.04± 2.1 | 49.29± 3.4 | 40.51± 2.2 |
| SAH+melatonin | 52.96± 1.9 | 45.98± 1.2 | 40.51± 2.2 | 27.01± 2.6# |

注:*P<0.01 与正常组比较;#P<0.01 与安慰剂治疗组比较

Note:Compared with control group:*P<0.01; Compared with vehicle group:#P<0.01

表 4 各组大鼠第 2-5 天总路程数据的比较(cm)

Table 4 Comparison of the swimming distance among different groups from the 2nd day to the 5th's(cm)

| Group | Day 2 | Day 3 | Day 4 | Day 5 |
|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| Control | 996.15± 101.4 | 695.49± 65.4 | 522.02± 59.2 | 384.8± 41.1 |
| SAH | 1481.94± 138.2 | 1210.49± 119.2 | 1237.25± 135.6 | 1139.99± 159.2* |
| SAH+vehicle | 1397.98± 129.3 | 1213.55± 119.5 | 1205.43± 142.3 | 1082.4± 99.4 |
| SAH+melatonin | 1390.74± 128.4 | 1069.76± 130.2 | 897.25± 92.1 | 647.99± 98.1# |

注:*P<0.01 与正常组比较;#P<0.01 与安慰剂治疗组比较

Note:Compared with control group:*P<0.01; Compared with vehicle group:#P<0.01

2.3 各组大鼠神经元细胞凋亡情况的比较

采用 TUNEL 染色检测各组大鼠神经元细胞的凋亡情况,结果显示:与正常对照组比较,单纯 SAH 组大鼠神经元细胞的凋亡百分显著增高(P<0.01),褪黑素治疗组神经元细胞凋亡百分比明显低于安慰剂治疗组(P<0.01),而安慰剂治疗组与单纯 SAH 组神经元细胞的凋亡百分比比较无统计学差异(P>0.05),如表 5。

2.4 各组大鼠神经元细胞坏死情况的比较

采用 Fluoro-Jade B 荧光染色检测各组大鼠神经元细胞的坏死情况,结果显示:与正常对照组比较,单纯 SAH 组大鼠神经元细胞坏死的百分比显著增高(P<0.01),褪黑素治疗组神经元细胞坏死的百分比显著低于安慰剂治疗组(P<0.05),而安慰

表 2 各组大鼠行为活动功能评分的比较

Table 2 Comparison of the Behavior and activity scores among different groups

| Group | Average Score |
|---------------|---------------|
| Control | 0.42± 0.12 |
| SAH | 2.75± 0.41* |
| SAH+vehicle | 2.67± 0.33 |
| SAH+melatonin | 1.25± 0.37# |

注:*P<0.01 与正常组比较;#P<0.05 与安慰剂治疗组比较

Note:Compared with control group:*P<0.01; Compared with vehicle group:#P<0.05

2.2 各组大鼠认知功能的比较

定位航行试验结果显示,在总计 16 次的水迷宫试验中,与其他各组相比,正常组逃避潜伏期及总路程明显降低(P<0.01),褪黑素治疗组与安慰剂组相比,逃避潜伏期和总路程明显减少(P<0.01)。(如表 3-4)

剂治疗组与单纯 SAH 组的神经元细胞坏死的百分比比较无统

表 5 各组大鼠神经元细胞凋亡情况的比较

Table 5 Comparison of the apoptosis of neurons among different groups

| Group | Positive cell percentage(%) |
|---------------|-----------------------------|
| Control | 6.5± 1.8 |
| SAH | 37.5± 5.1* |
| SAH+vehicle | 36.7± 4.2 |
| SAH+melatonin | 19.8± 2.1# |

注:*P<0.01 与正常组比较;#P<0.01 与安慰剂治疗组比较

Note:Compared with control group:*P<0.01; Compared with vehicle group:#P<0.01

计学差异($P>0.05$),如表 6。

表 6 各组大鼠神经元细胞坏死情况的比较

Table 6 Comparison of the necrosis of neurons among different groups

| Group | Positive cell percentage(%) |
|---------------|-----------------------------|
| Control | 8.5± 2.1 |
| SAH | 66.7± 5.4* |
| SAH+vehicle | 60.1± 4.4 |
| SAH+melatonin | 32.5± 2.9# |

注:* $P<0.01$ 与正常组比较;# $P<0.05$ 与安慰剂治疗组比较

Note:Compared with control group:* $P<0.01$; Compared with vehicle group: # $P<0.05$

3 讨论

认知功能障碍是自发性蛛网膜下腔出血和手术治疗动脉瘤后常见的继发性症状,甚至在格拉斯评分(glasgow outcome scale)较好的患者中,仍有 60%以上会在动脉瘤破裂或动脉瘤手术后的 3 至 6 月中出现一项甚至多项的认知功能障碍^[7]。如何改善继发性的认知功能障碍,已经越来越受到学术界及临床医生的关注。目前,Morris 水迷宫(Morris water maze, MWM)已经被广泛用于评估大鼠脑部功能损伤后后认知功能的改变^[8,9],本研究即用此方式评估大鼠 SAH 后继发性的认知功能障碍。

褪黑素(N-乙酰-5-甲氧基色胺)在人体内主要由松果体呈脉冲式分泌进入血液循环,并可以自由通过细胞膜和血脑屏障。褪黑素及其代谢物可通过高效率清除自由基,刺激抗氧化酶和谷胱甘肽(GSH)的合成,保护神经系统及其他组织免受氧化损伤^[10-13]。同时,褪黑素可以通过刺激神经元细胞增殖及动员外源性的神经前体细胞,促进神经元再生,改善神经退行性疾病症状^[14,15]。NO 是一种神经递质,在神经发育和信息传递过程中具有重要作用,参与多种神经功能,但若 NO 释放过多,则会诱发细胞毒作用,导致细胞损伤,加速神经元死亡或凋亡。研究表明,褪黑素能够减少大脑皮 NO 的生成与释放,从而抑制缺血缺氧所导致 NO 递质的过量释放^[16]。但褪黑素对于 SAH 后所产生的继发性认知功能障碍的影响目前尚未见报道。

本研究结果显示:SAH 大鼠的神经行为活动功能评分、逃避潜伏期和活动总路程均较正常大鼠明显增加,但褪黑素治疗的 SAH 大鼠以上指标较安慰剂治疗的 SAH 大鼠均显著降低,表明 SAH 大鼠存在严重的认知功能损害,而褪黑素能明显改善 SAH 后继发性的认知功能障碍。此外,SAH 大鼠的神经元细胞凋亡及坏死的百分比率明显高于正常大鼠,褪黑素治疗的大鼠神经元细胞凋亡及坏死百分比率较安慰剂治疗组有明显的下降,表明褪黑素能够减轻蛛网膜下腔出血后继发性神经元细胞凋亡及坏死。褪黑素可能通过减少 SAH 后神经元细胞的凋亡及坏死,从而改善 SAH 大鼠的空间学习等认知功能的障碍。但是褪黑素具体是通过何种机制来保护神经元,减少神经元细胞凋亡及坏死的,尚需要进一步的实验深入研究。

目前,对于自发性蛛网膜下腔出血后患者预后过程中,认知功能障碍恢复的关注日趋增多,如何提高患者 SAH 后生活质量和认知功能的恢复息息相关。本实验结果表明,褪黑素可改善 SAH 后继发的认知功能障碍,这对于改善脑血管疾病的预后具有重要的临床意义。

参考文献(References)

- [1] Tart ma HA. Early brain injury following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: emphasis on cellular apoptosis[J]. Turkish Neurosurgery, 2012, 22(5): 529-533
- [2] Brand C, Alber B, Fladung A K, et al. Cognitive performance following spontaneous subarachnoid haemorrhage versus other forms of intracranial haemorrhage [J]. British journal of neurosurgery, 2013, [Epub ahead of print]
- [3] Wang Z, Ma C, Meng C J, et al. Melatonin activates the Nrf2-ARE pathway when it protects against early brain injury in a subarachnoid hemorrhage model[J]. Journal of pineal research, 2012, 53(2): 129-137
- [4] Jeon H, Ai J, Sabri M, et al. Learning deficits after experimental subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Neuroscience, 2010, 169 (4): 1805-1814
- [5] Wang Z, Chen G, Zhu W W, et al. Influence of simvastatin on microthrombosis in the brain after subarachnoid hemorrhage in rats: a preliminary study[J]. Annals of Clinical & Laboratory Science, 2010, 40(1): 32-42
- [6] H Jeon, J Ai, M Sabri, et al. Learning deficits after experimental subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Neuroscience, 2010, 169 (4): 1805-1814
- [7] Samra S K, Giordani B, Caveney A F, et al. Recovery of cognitive function after surgery for aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Stroke, 2007, 38(6): 1864-1872
- [8] Skelton R W. Modelling recovery of cognitive function after traumatic brain injury: spatial navigation in the Morris water maze after complete or partial transections of the perforant path in rats [J]. Behavioural brain research, 1998, 96(1): 13-35
- [9] Liu X J, Yuan L, Yang D, et al. Melatonin protects against amyloid- β -induced impairments of hippocampal LTP and spatial learning in rats[J]. Synapse, 2013, 67(9): 626-636
- [10] Mauriz J L, Collado P S, Veneroso C, et al. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives[J]. Journal of Pineal Research, 2013, 54(1): 1-14
- [11] Fischer T W, Kleszczyński K, Hardkop L H, et al. Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin[J]. Journal of pineal research, 2013, 54(3): 303-312
- [12] Rodriguez C, Mayo J C, Sainz R M, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin[J]. Journal of pineal research, 2004, 36(1): 1-9
- [13] Galano A, Tan D X, Reiter R J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK[J]. Journal of Pineal Research, 2013, 54(3): 245-257
- [14] Sarlak G, Jenwitheesuk A, Chetsawang B, et al. Effects of Melatonin on Nervous System Aging: Neurogenesis and Neurodegeneration [J]. Journal of pharmacological sciences, 2013, [Epub ahead of print]
- [15] Ramirez-Rodriguez G, Vega-Rivera N, Benítez-King G, et al. Melatonin supplementation delays the decline of adult hippocampal neurogenesis during normal aging of mice [J]. Neuroscience letters, 2012, 530(1): 53-58
- [16] Coyle J T, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders[J]. Science, 1993, 262(5134): 689-695