

# Ifenprodil 减轻大鼠蛛网膜下腔出血后 脑水肿及皮质凋亡\*

密琼洁<sup>1</sup>, 韩萍<sup>2</sup>, 孙保亮<sup>1</sup>, 张宗勇<sup>1△</sup>

(<sup>1</sup>山东省脑微循环重点实验室, 泰山医学院附属医院神经内科, 山东 泰安 271016;

<sup>2</sup>临沂市妇女儿童医院神经科, 山东 临沂 276000)

**[摘要]** 目的: 探讨 *N*-甲基-D-天冬氨酸 (*N*-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体 GluN2B 亚基 (GluN2B-NMDA 受体) 的负向变构剂艾芬地尔 (ifenprodil) 对大鼠蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 后神经功能缺损、血脑屏障通透性、脑水肿及皮质细胞凋亡的影响。方法: 选取成年健康雄性 SD 大鼠 90 只, 分为假手术组 ( $n = 18$ )、SAH + 安慰剂组 ( $n = 36$ ) 和 SAH + ifenprodil 组 ( $n = 36$ ), 通过血管内穿刺法建立 SAH 模型。在建模后 2、24 和 48 h, 腹腔注射安慰剂或 ifenprodil。在建模后 72 h, Garcia 评分标准评价神经缺损, 脑干湿重法检测脑水肿, 伊文思蓝 (Evans blue) 法检测血脑屏障通透性, TUNEL 染色检测皮质细胞凋亡, Western blot 法检测凋亡信号分子的表达。结果: 与假手术组比较, SAH + 安慰剂组的神经功能评分降低, 脑组织含水率增加, 伊文思蓝有显著溢出, TUNEL 阳性细胞数显著增多, Bcl-2 的表达减弱, Bax 及 activated caspase-9/3 的表达增强 ( $P < 0.05$ ); 与 SAH + 安慰剂组相比, SAH + ifenprodil 组神经功能评分升高, 脑组织含水率降低, 伊文思蓝溢出量降低, TUNEL 阳性细胞减少, Bcl-2 的表达增加, Bax 及 activated caspase-9/3 表达减少 ( $P < 0.05$ )。结论: ifenprodil 能够减轻 SAH 后神经功能缺损和脑水肿, 降低血脑屏障的通透性, 减少皮质区细胞凋亡。

**[关键词]** 蛛网膜下腔出血; 艾芬地尔; 脑水肿; 皮质; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R743.35; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.08.007

## Ifenprodil reduces brain edema and cortical apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats

MI Qiong-jie<sup>1</sup>, HAN Ping<sup>2</sup>, SUN Bao-liang<sup>1</sup>, ZHANG Zong-yong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Cerebral Microcirculation in Universities of Shandong Province, Department of Neurology, Affiliated Hospital of Taishan Medical University, Taian 271016, China; <sup>2</sup>Department of Neurology, Linyi Women and Children Hospital, Linyi 276000, China. E-mail: zongyongzhanghust@163.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To explore the effect of ifenprodil, a negative allosteric modulator of GluN2B *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, on neurological deficit, permeability of blood-brain barrier, brain edema and cortical cell apoptosis after subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats. **METHODS:** Adult healthy male Sprague-Dawley rats ( $n = 90$ ) were divided into 3 groups: sham group ( $n = 18$ ), SAH + vehicle group ( $n = 36$ ), and SAH + ifenprodil group ( $n = 36$ ). The rat model of SAH was established by intracranial endovascular puncture. The rats received vehicle or ifenprodil at 2 h, 24 h and 48 h after surgery by intraperitoneal injection. The modified Garcia neurological scoring, dry and wet weight method, Evans blue dye extravasation method, TUNEL staining and Western blot were used to evaluate neurological deficit, brain water content, blood-brain barrier permeability and cortical cell apoptosis at 72 h after SAH. **RESULTS:** The neurological score and Bcl-2 expression were decreased, while the brain water content, the Evans blue dye extravasation, TUNEL-staining positive cells, and Bax and activated caspase-3/9 protein levels in the basal cortex were increased significantly in SAH + vehicle group as compared with sham group ( $P < 0.05$ ). However, ifenprodil treatment significantly inhibited these SAH-induced changes ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** Ifenprodil attenuates neurological deficits and brain edema, and reduces blood-brain barrier permeability and cortical apoptosis after SAH.

**[KEY WORDS]** Subarachnoid hemorrhage; Ifenprodil; Brain edema; Cortex; Apoptosis

[收稿日期] 2018-10-15 [修回日期] 2018-12-29

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81671141)

△通讯作者 Tel: 0538-6222636; E-mail: zongyongzhanghust@163.com

蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 是一种病死率和致残率高的脑血管疾病, 主要病因是颅内动脉瘤破裂而引起血液进入蛛网膜下腔。SAH 后的脑损伤主要涉及神经功能缺损、血脑屏障被破坏后通透性的增加、脑组织水肿、脑血管痉挛及细胞的坏死和凋亡等病理反应<sup>[1-3]</sup>。研究观察, 临床 SAH 患者和实验 SAH 模型的脑脊液中含有高浓度的谷氨酸<sup>[4-7]</sup>, 过量的谷氨酸使得谷氨酸受体过度激活进而发生谷氨酸兴奋性毒性, 触发钙超载而引起脑损伤<sup>[8]</sup>。谷氨酸毒性下, 位于突触外的 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA) 受体 GluN2B 亚基 (GluN2B-NMDA 受体) 引起钙超载及神经元死亡<sup>[9-10]</sup>。艾芬地尔 (ifenprodil) 是选择性抑制 GluN2B-NMDA 受体的负向变构剂, 能特异性地结合在受体的氨基末端结构域<sup>[11]</sup>。目前酒石酸艾芬地尔作为临床药物在日本和法国用于脑梗死后遗症和脑出血后伴随的头晕等症状的改善, 但该药对 SAH 后脑损伤的影响, 尤其是 SAH 后脑水肿及细胞凋亡的影响还不清楚。

本研究通过颅内血管穿刺法制作稳定的大鼠 SAH 模型, 探讨艾芬地尔对 SAH 后神经功能缺损、血脑屏障通透性、脑水肿及皮质细胞凋亡的影响, 为临床 SAH 患者的治疗提供实验依据。

## 材 料 和 方 法

### 1 实验动物和分组

SPF 级成年雄性 SD 大鼠 (体重 270 ~ 320 g, 10 周龄), 购买自济南朋悦实验动物中心, 动物合格证号: SCXY (鲁) 20140007。饲养室温 23 ~ 25 °C, 相对湿度 60% ~ 65%, 分笼饲养, 环境通风良好, 食物及水分按时摄入, 12 h 光/暗周期循环。将 90 只大鼠分为 3 组: 假手术 (sham) 组 ( $n = 18$ )、SAH + 安慰剂 (SAH + vehicle) 组 ( $n = 36$ ) 和 SAH + ifenprodil 组 ( $n = 36$ )。所有动物实验均经泰山医学院动物伦理委员会批准。

### 2 方法

**2.1 大鼠 SAH 模型制作及实验设计** 采用颈内动脉穿刺法建立 SAH 实验动物模型<sup>[12-13]</sup>。实验大鼠采用 10% 水合氯醛麻醉 (腹腔注射, 4 mL/kg), 将麻醉好的大鼠仰卧固定到手术台上, 颈部用碘伏擦拭, 沿颈中线剪 2 cm 皮肤切口, 小心分离出右侧颈总、颈内和颈外动脉, 电凝并切断颈外动脉外侧及内侧的 2 个分支后, 结扎右颈总动脉近心端, 右颈外动脉远心端, 并在距颈动脉分叉部 5 mm 处结扎颈外动脉。然后, 用显微镊子把 4-0 线栓逆向插入颈总动脉

进而颈内动脉, 入颅内约 18 mm 而且有阻力感, 再推入 2 ~ 3 mm 并伴随有突破感, 停留 10 s, 将线栓退出, 以保证颈内动脉再灌注, 缝合并消毒切口。假手术组仅使得线栓至有阻力感停止, 其余手术步骤与上述方法相一致。3 组的死亡率如下: 假手术组 0%, 18 只均存活; SAH + 安慰剂组 33.3%, 36 只中 12 只死亡; SAH + ifenprodil 组 27.8%, 36 只中 10 只死亡。每组存活的大鼠处理如下: 伊文思蓝 (Evans blue) 法评估血脑屏障通透性实验 ( $n = 6$ ), 分离脑组织用于脑水肿检测和 Western blot 样品制备 ( $n = 6$ ), 以及制作脑组织冰冻切片 ( $n = 6$ )。

**2.2 SAH grade 评分** SAH 的严重程度是通过 18 分的 SAH 分级评估系统完成的<sup>[14]</sup>。通过 Willis 环及脑底部动脉分为 6 个节段, 根据每个节段内蛛网膜下腔出血血块的数量, 将每个节段分为 0 ~ 3 分。评分 0: 无蛛网膜下腔出血; 评分 1: 少量的蛛网膜下腔血块; 评分 2: 中度的蛛网膜下腔血凝块但可见动脉; 评分 3: 蛛网膜下腔血凝块覆盖所有动脉。SAH grade 评分总和由所有 6 个节段的分数计算出来的。实验选取 12 ~ 13 分的 SAH 模型, 低于或者高于此范围的 SAH 大鼠将被排除在实验之外。

**2.3 腹腔注射 ifenprodil** 在术后 2 h、24 h 和 48 h, 腹腔注射给予安慰剂 (含 5% DMSO 的无菌水) 或 10 mg/kg ifenprodil (ab120111, Abcam; 溶解于 5% DMSO 的无菌水)。

**2.4 神经功能评分** 在术后 72 h, 实验双盲者采用 Garcia 神经功能学评分评估 SAH 后神经功能缺损<sup>[14]</sup>。包括 6 项测试: 得分 0 ~ 3 (自主运动检测、四肢活动检测、前爪运动及力量) 和 1 ~ 3 (身体的本体感觉、攀爬实验检测和触觉实验检测), 评分通过所有 6 项测试的分数相加得到。评分分为 3 个等级: 1 ~ 6 分为重度神经功能损伤, 7 ~ 12 分为中度神经功能损伤, 13 ~ 18 分为轻度神经功能损伤。

**2.5 干湿重法检测脑水肿** 在术后 72 h, 通过干湿重法检测 SAH 后脑水肿情况<sup>[12]</sup>。将脑组织迅速分离为左侧和右侧大脑半球, 称得脑组织湿重, 然后于 100 °C 烘箱中烘 3 d, 称得干重, 脑组织含水率 (%) = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

**2.6 Evans blue 法检测血脑屏障通透性** 在术后 71 h, 采用伊文思蓝法评估血脑屏障通透性<sup>[12]</sup>。大鼠采用 10% 水合氯醛麻醉 (腹腔注射, 4 mL/kg), 将麻醉好的大鼠仰卧固定到手术台上, 股静脉注射 2% 伊文思蓝 (3.3 mL/kg), 待循环 1 h 后, 打开胸腔, 用 12 号针头经左心室插入心脏, 并在右心耳处剪口, 用恒流泵将 60 mL 0.9% 等渗盐水灌注入心脏, 行断头取

脑,迅速分离出脑组织。精确称量脑皮质组织质量,置于50%(W/V)的三氯乙酸匀浆,匀浆液与等体积的混合溶液(无水乙醇:三氯乙酸=3:1)置于摇床上孵育12 h,然后离心取上清液。在96孔板上,设置空白孔、对照孔、伊文思蓝不同浓度孔(0、0.5、1、2、4、6、8和10  $\mu\text{g/L}$ )及待测样品孔,在酶标仪激发波长620 nm、发射波长680 nm下测定吸光度(A)值。在Excel中根据伊文思蓝不同浓度对应的A值绘制标准曲线,计算出样品中的伊文思蓝含量,以假手术组的数值为标准1,得出各组伊文思蓝溢出量的相对变化。

**2.7 TUNEL 染色** 在术后72 h, TUNEL 染色检测皮质区细胞凋亡<sup>[15]</sup>。大鼠采用10%水合氯醛麻醉(腹腔注射,4 mL/kg),经心脏反式灌注4%多聚甲醛后,取脑并用OCT试剂包埋,使用冰冻切片机切片(10  $\mu\text{m}$ 厚,前囟开始至-3 mm)。取冠状位脑切片,用0.1% TritonX-100破膜5 min,使用TUNEL试剂盒(#11684795910, Roche)染色90 min,然后PBS洗涤3遍,用含有DAPI的防止荧光淬灭剂封片,然后用免疫荧光显微镜观察,ImageJ软件对图片分析。

**2.8 Western blot** 在术后72 h,采用Western blot检测皮质区Bcl-2、Bax和activated caspase-9/3表达<sup>[15]</sup>。大鼠采用10%水合氯醛麻醉(腹腔注射,4 mL/kg),选取Willis环两侧,以分离基底皮质组织,用蛋白质提取试剂盒(BC3710, Solarbio)提取大脑皮质总蛋白,然后用BCA蛋白检测试剂盒(PC0020, Solarbio)测定蛋白浓度。SDS-PAGE分离制备好的蛋白样品,并将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,然后用5%的脱脂牛奶进行封闭。膜分别与I抗[Bcl-2(1:200)和Bax(1:200), Santa Cruz Biotechnology; activated caspase-9(1:1 000)、activated caspase-3(1:1 000)和 $\beta$ -actin(1:1 000), Cell signaling technology]在4  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;TBST缓冲液洗涤膜3遍后,用抗兔或抗小鼠IgG酶联抗体(1:3 000)在室温下孵育2 h,然后再用TBST缓冲液洗涤3遍,加入化学发光底物,利用凝胶成像系统观察蛋白条带,ImageJ软件对图片分析。

### 3 统计学方法

实验数值以均数 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)表示,使用GraphPad Prism 7.0软件通过单因素方差分析进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 SAH 程度分级、神经功能评分、伊文思蓝溢出量及脑组织含水率

SAH后,颅底表面、Willis环及脑干上存在显著出血点,图1A。在SAH grade上,SAH+安慰剂组与SAH+ifenprodil组之间没有显著差异( $P > 0.05$ ),见图1A。在SAH术后72 h,SAH+安慰剂组的神经功能评分低于假手术组,说明SAH后有神经功能的缺损,而SAH+ifenprodil组的神经功能评分高于安慰剂组( $P < 0.05$ ),图1B。在SAH术后72 h,假手术组伊文思蓝几乎无溢出;SAH+安慰剂组与SAH+ifenprodil组均有伊文思蓝溢出,但ifenprodil组的伊文思蓝含量低于安慰剂组( $P < 0.05$ ),见图1C。类似地,与假手术组比较,SAH+安慰剂组的大鼠左、右脑半球的脑组织含水率显著增加( $P < 0.05$ ),而SAH+ifenprodil组的脑组织含水率相较于SAH+安慰剂组显著降低( $P < 0.05$ ),见图1D。

### 2 TUNEL 染色结果

在SAH后72 h,SAH+安慰剂组基底皮质的TUNEL阳性细胞数显著增加,假手术组不显著;相比SAH+安慰剂组,SAH+ifenprodil组的TUNEL阳性细胞数显著减少( $P < 0.05$ ),见图2。

### 3 Bcl-2、Bax 和 activated caspase-9/3 表达

在SAH后72 h,与假手术组相比较,Western blot检测显示SAH+安慰剂组的Bcl-2水平降低,而Bax及activated caspase-3/9表达上调;与SAH+安慰剂组相比,SAH+ifenprodil组的Bcl-2表达上调,Bax及activated caspase-3/9表达下调( $P < 0.05$ ),见图3。

## 讨 论

SAH后早期脑损伤涉及一系列病理生理的级联反应,如炎症反应、血脑屏障的破坏、脑水肿和细胞凋亡等,这些级联反应与SAH后认知及运动感觉运动障碍有密切关系<sup>[16]</sup>。有研究表明,美金刚作为NMDA受体的拮抗剂,在SAH动物模型上能够减轻SAH后的脑损伤、脑血管痉挛及神经功能的缺损<sup>[17-18]</sup>;另有研究表明,选择性NMDA受体NB2B亚型的拮抗剂RO25-6981可使SAH后大鼠的认知功能障碍进一步加重<sup>[19]</sup>;本研究通过血管内穿刺法制作SAH大鼠模型,观察到SAH后有明显的神经功能缺损,而ifenprodil能改善SAH引起的神经功能缺损,对于其在认知功能障碍方面的影响有待于进一步研究。Ifenprodil作为选择性GluN2B-NMDA受体拮抗剂,能够阻断兴奋性谷氨酸毒性导致的 $\text{Ca}^{2+}$ 大量内流,从而起到保护神经细胞钙超载的作用。这可能是ifenprodil改善SAH后神经功能缺损的原因。本研究利用伊文思蓝法观察,ifenprodil能降低SAH引起的血脑屏障通透升高。有文献报道表明,脑血

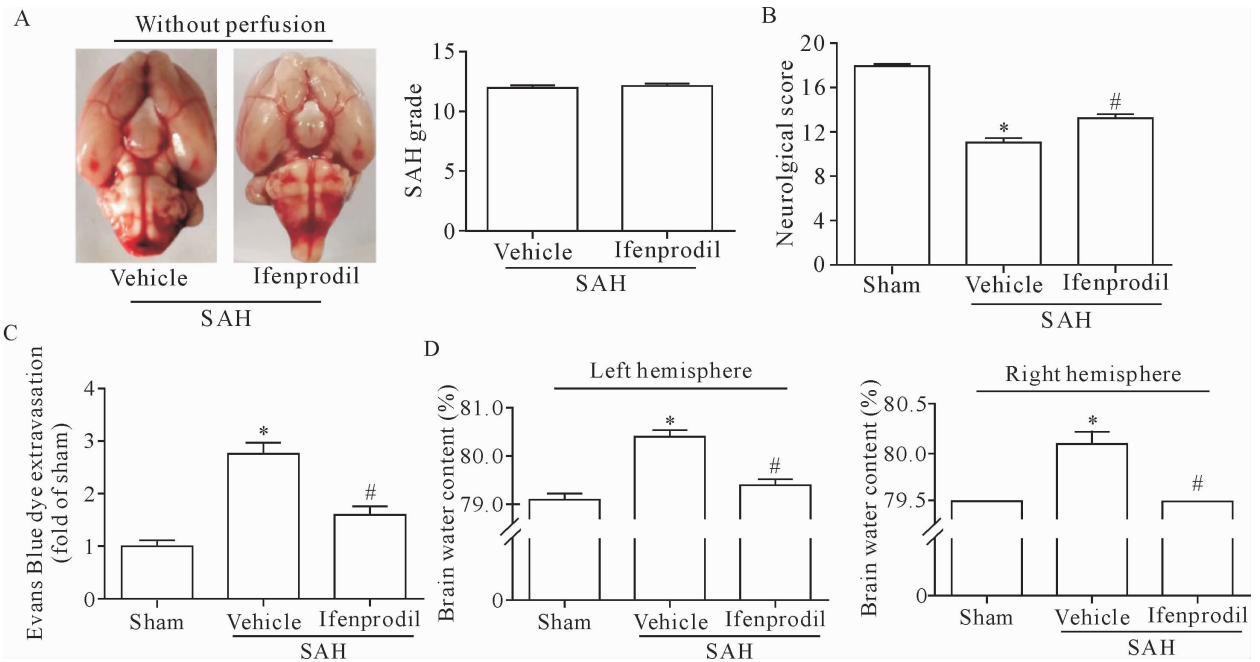


Figure 1. The effect of ifenprodil on neurological score, Evans Blue dye extravasation and brain water content at 72 h after SAH. A: the representative images showed rat brains in vehicle- and ifenprodil-treated SAH groups, and the bar chart showed that there was no statistical difference in SAH grading between vehicle- and ifenprodil-treated SAH groups; B, C and D: ifenprodil increased neurological score, and reduced Evans Blue dye extravasation and brain water content at 72 h after SAH. Mean  $\pm$  SEM.  $n = 6$ . \* $P < 0.05$  vs sham group; # $P < 0.05$  vs SAH + vehicle group.

图1 Ifenprodil 对 SAH 后神经功能评分、伊文思蓝溢出量及脑组织含水率的影响

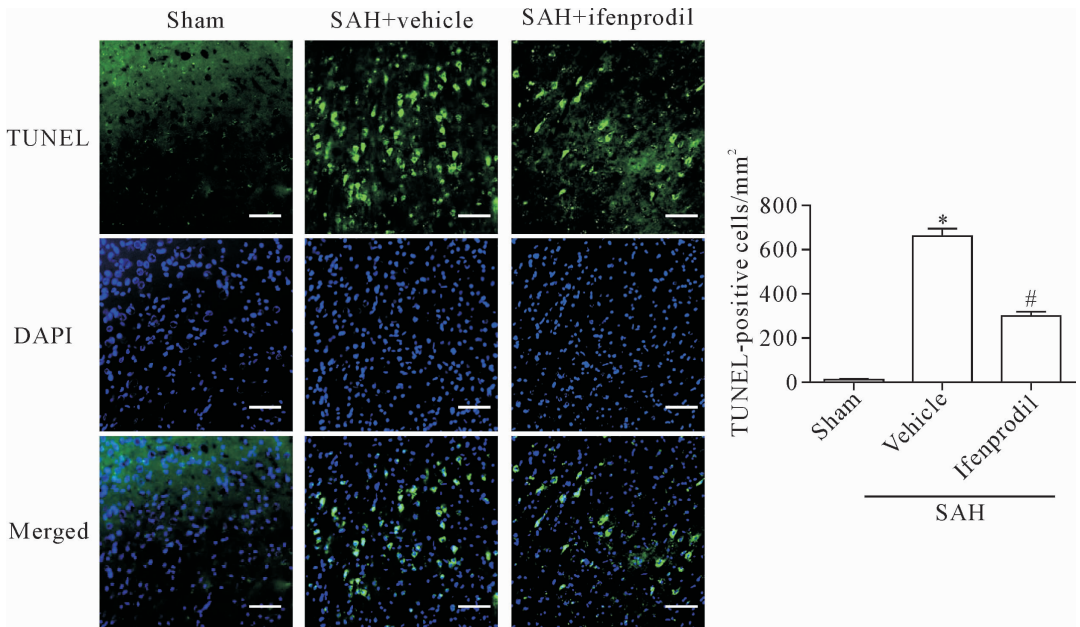


Figure 2. Ifenprodil reduced the TUNEL-positive cells in basal cortex at 72 h after SAH. The scale bar = 50  $\mu$ m. Mean  $\pm$  SEM.  $n = 6$ . \* $P < 0.05$  vs sham group; # $P < 0.05$  vs SAH + vehicle group.

图2 Ifenprodil 减少 SAH 后基底皮质区 TUNEL 阳性细胞数

管内皮细胞上表达 NMDA 受体,谷氨酸能通过激活内皮细胞上的 NMDA 受体而引起内皮细胞的完整性降低,进而引起血脑屏障破坏<sup>[20]</sup>;在 SAH 实验动物模型上,NMDA 受体的拮抗剂 felbamate 能够减轻神

经功能缺损及血脑屏障通透升高<sup>[21]</sup>。基于文献和本研究,我们推测 SAH 后谷氨酸毒性可能通过激活 NMDA 受体引起脑血管内皮细胞完整性降低,而 ifenprodil 能够抑制 GluN2B-NMDA 受体介导的钙超

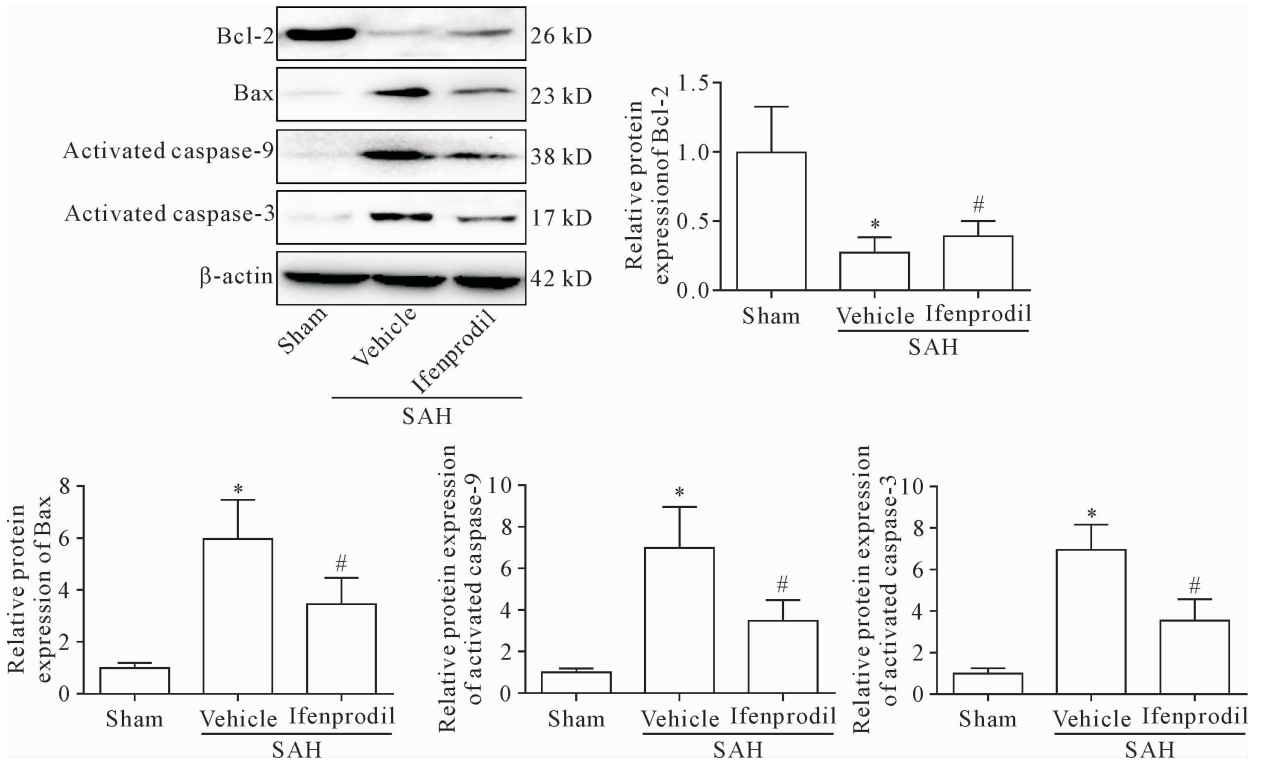


Figure 3. Ifenprodil increased the Bcl-2 expression, and decreased the Bax, activated caspase-9 and activated caspase-3 protein levels in basal cortex at 72 h after SAH. Mean ± SEM. n = 6. \* P < 0.05 vs sham group; # P < 0.05 vs SAH + vehicle group.

图3 Ifenprodil 增加 SAH 后 Bcl-2 表达,减少 Bax 和 activated caspase-9/3 蛋白表达

载,进而保护血脑屏障。在 SAH 后,在早期脑损伤中存在脑组织水肿的现象。本研究显示,ifenprodil 可以减轻 SAH 后的脑水肿。有文献报道,SAH 后水通道蛋白 AQP4 表达升高,而且和脑水肿形成一致<sup>[22]</sup>; ifenprodil 能够下调 AQP4 表达<sup>[23]</sup>。我们推测 ifenprodil 可能抑制了 SAH 后 AQP4 的表达,而减轻 SAH 后脑水肿,有待于进一步实验证实。

在 SAH 后,过多的谷氨酸引起的兴奋性毒性导致细胞内 Ca<sup>2+</sup> 和 Na<sup>+</sup> 的升高,进而导致线粒体功能障碍,这是突触后神经元凋亡的原因<sup>[24]</sup>。NMDA 受体拮抗剂可以破坏谷氨酸释放和过量受体激活之间的正反馈环路。本研究显示,SAH 后基底皮质区存在明显的细胞凋亡,而 ifenprodil 能够减少此细胞凋亡。文献报道,Bcl-2 和 Bax 蛋白的构成比例是细胞凋亡调控的关键,当 Bcl-2 蛋白被抑制时,Bax 形成同源二聚体而诱导细胞凋亡;当 Bcl-2 蛋白表达增加时,可与 Bax 形成异源二聚体而抑制细胞凋亡<sup>[25]</sup>。本研究显示,SAH 引起 Bcl-2 表达下调,Bax 表达上调,这意味着 Bax 比例增多而诱导细胞凋亡,而 ifenprodil 能够增加 Bcl-2 并且降低 Bax 表达。当 Bax 表达升高后,往往引起线粒体膜通透性增加,释放线粒体色素 C 而引起活化 caspase-9 激活,随后活化 caspase-3 激活,最终引起细胞凋亡。本研究观察,ifenprodil 能够减少 SAH 引起的活化 caspase-9/3 激

活,进一步证实了 ifenprodil 可以抑制 SAH 后的细胞凋亡,而发挥脑保护作用。

综上所述,ifenprodil 可能通过抑制兴奋性毒性导致的 GluN2B-NMDA 受体过度激活来缓解 SAH 后早期脑损伤,表现在可以减轻神经功能缺损和脑水肿,降低血脑屏障的通透性,抑制基底皮质区细胞凋亡。本研究结果可能为酒石酸艾芬地尔临床用于 SAH 的治疗提供了参考资料。

[参 考 文 献]

- [1] 孙保亮,夏作理,杨明峰,等. L-精氨酸对大鼠蛛网膜下腔出血后一氧化氮含量及脑水肿的影响[J]. 中国病理生理杂志,2002(06):59-61.
- [2] Chen S, Feng H, Sherchan P, et al. Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage [J]. Prog Neurobiol, 2014,115:64-91.
- [3] Fujii M, Yan J, Rolland WB, et al. Early brain injury, an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research [J]. Transl Stroke Res, 2013,4(4):432-446.
- [4] Jung CS, Lange B, Zimmermann M, et al. CSF and serum biomarkers focusing on cerebral vasospasm and ischemia after subarachnoid hemorrhage [J]. Stroke Res Treat, 2013,2013: 560305.
- [5] Samuelsson C, Hillered L, Zetterling M, et al. Cerebral glutamine and glutamate levels in relation to compromised

- energy metabolism; a microdialysis study in subarachnoid hemorrhage patients [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007,27(7):1309-1317.
- [6] Feng D, Wang W, Dong Y, et al. Ceftriaxone alleviates early brain injury after subarachnoid hemorrhage by increasing excitatory amino acid transporter 2 expression via the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Neuroscience*, 2014,268:21-32.
- [7] Kuo CP, Lu CH, Wen LL, et al. Neuroprotective effect of curcumin in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage [J]. *Anesthesiology*, 2011, 115 (6):1229-1238.
- [8] Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection [J]. *Prog Neurobiol*, 2014,115:157-188.
- [9] Liu Y, Wong TP, Aarts M, et al. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(11):2846-2857.
- [10] Tu W, Xu X, Peng L, et al. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke [J]. *Cell*, 2010,140(2):222-234.
- [11] Karakas E, Simorowski N, Furukawa H. Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors [J]. *Nature*, 2011,475(7355):249-253.
- [12] Zhang ZY, 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.
- [13] 孙保亮,夏作理,杨明峰,等. 银杏叶制剂对蛛网膜下腔出血早期大鼠脑缺血的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2000,16(3):75-77.
- [14] 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.
- [15] Zhang ZY, Sun BL, Liu JK, 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.
- [16] Kooijman E, Nijboer CH, van Velthoven CT, et al. The rodent endovascular puncture model of subarachnoid hemorrhage: mechanisms of brain damage and therapeutic strategies [J]. *J Neuroinflammation*, 2014,11:2.
- [17] Huang CY, Wang LC, Wang HK, et al. Memantine alleviates brain injury and neurobehavioral deficits after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(3):1038-1052.
- [18] Huang CY, Wang LC, Shan YS, et al. Memantine attenuates delayed vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage via modulating endothelial nitric oxide synthase [J]. *Mol Sci*, 2015, 16(6):14171-14180.
- [19] Chen G, Li Q, Wang Z, et al. Expression of NR2B in different brain regions and effect of NR2B antagonism on learning deficits after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *Neuroscience*, 2013,231:136-144.
- [20] Sharp CD, Hines I, Houghton J, et al. Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(6):H2592-H2598.
- [21] Germano A, Caffo M, Angileri FF, et al. NMDA receptor antagonist felbamate reduces behavioral deficits and blood-brain barrier permeability changes after experimental subarachnoid hemorrhage in the rat [J]. *J Neurotrauma*, 2007,24(4):732-744.
- [22] Cao S, Zhu P, Yu X, et al. Hydrogen sulfide attenuates brain edema in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats: possible involvement of MMP-9 induced blood-brain barrier disruption and AQP4 expression [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 621:88-97.
- [23] Xiao F, Pardue S, Arnold TC, et al. Ifenprodil treatment is associated with a down-regulation of brain aquaporin 4 following cardiac arrest in rats [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2005, 95:415-419.
- [24] Kostandy BB. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire [J]. *Neurol Sci*, 2012, 33(2):223-237.
- [25] Willis S, Day CL, Hinds MG, et al. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 20):4053-4056.

(责任编辑:林白霜,罗森)