

复方三七纳米颗粒对颅脑损伤大鼠血脑屏障和血清 TNF- α 和 IL-6 的影响

王珠,赵雅宁,李建民*,黄海玲,刘文倩
(河北联合大学护理与康复学院,河北唐山 063000)

[摘要] **目的:**观察复方三七纳米颗粒对脑创伤后大鼠血脑屏障、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)的影响作用。**方法:**用 Feeney 自由落体撞击法建立成年雄性大鼠脑创伤模型,96 只实验动物随机分为空白对照组、创伤模型组、复方三七纳米颗粒低、高剂量组(0.6,2.4 g·kg⁻¹),每组 24 只大鼠。第 1,3,5 天参照 ZeaLonga 法,对各组实验大鼠进行神经功能缺损评分;之后经腹主动脉穿刺取血,用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测量各组不同时间点大鼠($n=8$)血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)含量的变化;之后处死大鼠,取造模损伤部位脑组织(约 4 mm×4 mm×3 mm)称重计算脑组织含水量,观察用药后各时间点大鼠脑水肿情况。**结果:**与空白对照组比较,模型组神经功能缺损评分升高,脑组织含水量、TNF- α 和 IL-6 含量均增加;与模型组比较,复方三七纳米颗粒干预组中神经功能缺损评分降低,脑组织含水量、TNF- α 和 IL-6 含量均降低,并且随着剂量的增加上述变化显著($P<0.05$)。**结论:**复方三七纳米颗粒对大鼠脑创伤后有保护作用,与 TNF- α 的含量降低和 IL-6 含量增加有关。

[关键词] 复方三七纳米颗粒; 颅脑损伤; 血脑屏障; 肿瘤坏死因子- α ; 神经功能缺损评分; 脑水肿; 白介素-6

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0270-04

[doi] 10.11653/syfy2013240270

Effects of Compound Notogin Sengnano Granules on Blood Brain Barrier, Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6 after Brain Injury in Rats

WANG Zhu, ZHAO Ya-ning, LI Jian-min*, HUANG Hai-ling, LIU Wen-qian
(Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of the compound Notogin Sengnano granules on blood brain barrier, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in rats after traumatic brain injury. **Method:** The trauma model were established according to the Feeney free-fall impact brain injury using adult male rats. The nine-six rats were divided into four groups: control group, model group, low-dose compound Notogin Sengnano granules group (0.6 g·kg⁻¹) and high-dose compound Notogin Sengnano granules group (2.4 g·kg⁻¹). The rats in each group were scored according to the ZeaLonga neural function score. At the 1, 3, 5 d, blood samples were collected to detect detect (TNF- α) and IL-6 by ELISA. The brain tissue were collected for determination of water content. **Result:** Compared with control group, in model group the neural function defect score was increased, the brain water contents significantly increased, the contents of TNF- α and IL-6 content were increased. Compared with model group, in compound Notogin Sengnano gragules group, the neural function defect score, the brain water contents, TNF- α and IL-6 levels were decreased, significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** The compound Notogin Sengnano granules can promote the recovery of neural function and reduce the content of the TNF- α and IL-6 in rats after the traumatic brain injury.

[Key words] Compound Notogin sengnano granules; traumatic brain injury; blood brain barrier; tumor necrosis factor- α ; neurologic deficit score; brain edema; interleukin-6

[收稿日期] 20130409(009)

[基金项目] *河北省科技厅支撑项目(202761020)

[通讯作者] *李建民, Tel:15081978570, E-mail:zyning789@126.com

急性颅脑外伤是神经外科的常见病和多发病。近年来,有关脑损伤后内源性脑损害因子和脑保护因子的研究成为热点^[1]。颅脑损伤可使炎症反应及免疫异常持续放大而影响血脑屏障的稳定性,血脑屏障损害进而引起血管源性脑水肿,IL-6 和 TNF- α 等在颅脑损伤后表达明显增加,并通过介导细胞与细胞间的作用或直接毒性作用,使细胞水肿、崩解,在神经细胞生化功能紊乱和脑外伤后继发性脑损伤中起着重要作用^[1-3]。笔者在大量临床资料中发现,复方三七纳米颗粒治疗颅脑损伤患者有很好的治疗效果,为进一步探讨复方三七纳米颗粒保护颅脑损伤作用机制,笔者复制了颅脑损伤大鼠模型,并在此模型基础上观察复方三七纳米颗粒对颅脑损伤大鼠超微结构和血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白介素-6 (IL-6) 含量的影响。

1 材料

1.1 动物 健康清洁级 Wistar 大鼠 96 只,体重 200 ~ 220 g,雄性,适应性喂养 1 周。动物等级一级。由河北联合大学实验动物中心提供。动物许可证号 SCXK(京)2006-0009。

1.2 药物和试剂 复方三七纳米颗粒(由三七、红参、琥珀等组成的中药配方颗粒,广东一方制药有限公司,批号 0708001);TNF- α 放射免疫试剂盒(上海索莱宝生物科技有限公司,批号 FX-000001)和 IL-6 (天津灏洋生物制品科技有限公司,批号 F061025)放射免疫试剂盒;10% 水合氯醛由上海西唐生物技术有限公司,批号 20120715)。

1.3 仪器 JEOL-1230 透射电镜(日产),LDZ5-2 型离心机(北京离心机厂),莱卡病理成像系统(德国莱卡),RM2015 切片机(德国莱卡),SW-CJ-IF 型超净工作台(苏州净化设备集团),ACS-IEAS 型电子秤(北京菲姆斯科技开发公司),303-4A 数显电热保温箱(上海阳光实验仪器有限公司),DSHZ-300 型恒温水浴箱(江苏太仓医用仪器厂),CMOS 显微镜(日本奥林巴斯)。

2 方法

2.1 动物分组和造模 96 大鼠按随机数字法分为正常对照组(24 只)、模型组(24 只)、复方三七纳米颗粒低、高剂量组(0.6,2.4 g·kg⁻¹,各组 24 只)。每组又分为 1,3,5 d 3 个时间亚组。模型制备参照高燕等^[4]改进 Feeney 自由落体撞击法制作大鼠颅脑损伤模型:腹腔注射 10% 水合氯醛(3.5 mg·kg⁻¹),重 50 g,直径 15 mm 的铁制砧码自 35 cm 高度垂直撞击大鼠冠状缝后大鼠左眼至左耳连线中内

1/3 处的铁制撞杆,造成大鼠颅脑损伤模型,空白对照组仅开骨窗后缝合。干预组造模后开始给药,用药量参照人与大鼠体表面积等效剂量折算后,各组等容灌胃给药,每日给药 2 次,空白对照组与创伤模型组均予生理盐水 2 mL/次灌胃。

2.2 神经功能缺损评分(neurologic deficit score, NDS) 各组的行为学观察和评分均在取材前进行,死亡大鼠及时剔除,按随机原则补充实验动物数。参照有关文献和经过多次预实验后,根据 ZeaLunga 评分法,对造模后各组大鼠取伤后(1,3,5 d)共 3 个时相点进行评分,得分越高,说明其神经功能损伤程度越重。评分标准如下:0 分,无神经功能缺损症状;1 分,轻微神经功能缺损,不能完全伸展右侧前爪;2 分,中度局灶神经功能缺损,向右侧转圈;3 分,重度局灶神经功能缺损,向右侧倾倒;4 分,不能自行行走,意识水平下降。

2.3 取材及指标检测 评分之后根据大鼠体重用 10% 水合氯醛(3.5 mL·kg⁻¹) ip,腹主动脉取血 5 mL,经离心(4 °C,3 000 r·min⁻¹ × 5 min)分离血清,-80 °C 保存标本。采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测量各组($n = 8$)不同时间点大鼠的血清 TNF- α 和 IL-6 的含量变化。指标的测定严格按照相应试剂盒说明书操作进行。

2.4 脑组织含水量的测定 取血之后处死大鼠,取造模损伤部位脑组织(约 4 mm × 4 mm × 3 mm)用干湿法计算脑组织含水量,观察用药后各时间点大鼠脑水肿情况。按 Elliott 公式计算脑组织含水量。

$$\text{脑组织含水量} = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$$

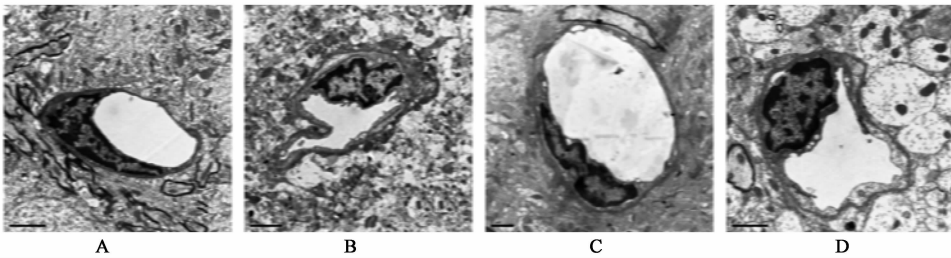
2.5 脑组织超微结构检测 各组各时间取 1 或 2 只动物,以 0.4% 戊巴比妥钠麻醉动物,混合固定液(2.5% 戊二醛和 2% 多聚甲醛的磷酸缓冲液)心脏灌流,参照包新民的《大鼠脑立体定位图谱》^[5],剥离脑组织,冰台上取大脑冠状缝左右 0.2 厘米组织,切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 组织块,立即以 4% 戊二醛固定,0.1 mol·L⁻¹ 二甲磺酸缓冲液冲洗 2 遍,1% 四氧化锇固定,缓冲液冲洗,逐级脱水,包埋,超薄切片,醋酸铀枸橼酸铅染色。H-7650 型(日本日立公司)透射电镜观察脑组织超微结构的变化。

2.6 统计学分析 所得数据均输入数据库,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学处理。完全随机设计的单因素多个样本均数间的两两比较,当方差齐时采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同时点神经功能缺损评分的变化 与空白对照组相比,模型组神经功能缺损评分均值在伤后 1 d 达高峰,3,5 d 都有明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,复方三七纳米颗粒(简称三七纳米)高、低剂量组神经功能缺损评分均值在伤后 1 d 达高峰,3,5 d 均有明显降低($P < 0.01$),但均低于模型组($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 损伤脑组织中毛细血管超微结构的变化 空白对照组血管内皮细胞结构正常,基膜厚薄均匀;模型组血管内皮细胞肿胀、管腔受压,狭窄、管壁迂曲不平、缝隙连接断裂、基膜松散、模糊甚至分离;复



A. 正常组;B. 模型组;C. 复方三七纳米颗粒 0.6 g·kg⁻¹组;
D. 复方三七纳米颗粒 2.4 g·kg⁻¹组

图 1 复方三七纳米颗粒对颅脑损伤后大鼠脑组织中毛细血管超微结构的影响(透射电镜,×20 000)

3.3 不同时点脑组织含水量的变化 与空白对照组相比,模型组脑组织含水量在伤后 1 d 就明显升高,3 d 达高峰、5 d 仍明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,复方三七纳米颗粒高、低剂量组脑组织含水量在伤后 1 d 开始降低,3,5 d 均有明显减少($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 复方三七纳米颗粒对颅脑损伤后大鼠不同
时点脑组织含水量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$) %

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	伤后脑组织含水量		
		1 d	3 d	5 d
空白对照	-	58.60 ± 0.01	58.60 ± 0.01	58.60 ± 0.01
创伤模型	-	73.86 ± 1.37 ¹⁾	78.97 ± 1.69 ¹⁾	69.32 ± 0.56 ¹⁾
三七纳米	0.6	65.70 ± 0.32 ²⁾	68.86 ± 1.37 ²⁾	62.68 ± 1.28 ²⁾
	2.4	64.10 ± 2.13 ²⁾	67.67 ± 1.38 ²⁾	61.40 ± 1.72 ²⁾

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.01$;与创伤模型组相比²⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 不同时点血清 TNF-α 含量的变化 与空白对照组相比,创伤模型组血清 TNF-α 含量伤后 1 d 明显升高,3 d 达高峰、5 d 仍明显升高($P < 0.05$);与模型组相比,复方三七纳米颗粒高、低剂量组血清 TNF-α 含量在伤后 1 d 明显降低,3,5 d 仍明显减少($P < 0.01$)。见表 3。

表 1 复方三七纳米颗粒对颅脑损伤后大鼠不同时点
神经功能评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	神经功能评分/分		
		伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 5 d
空白对照	-	1.01 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
创伤模型	-	2.81 ± 0.18 ¹⁾	2.26 ± 0.14 ¹⁾	1.75 ± 0.14 ¹⁾
三七纳米	0.6	2.79 ± 0.19 ²⁾	1.93 ± 0.19 ²⁾	1.09 ± 0.13 ²⁾
	2.4	2.78 ± 0.13 ²⁾	1.89 ± 0.13 ²⁾	1.08 ± 0.19 ²⁾

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.01$;与创伤模型组相比²⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

方三七纳米颗粒干预组内皮细胞,膜结构完整、清晰,基膜厚薄均匀。见图 1。

表 3 复方三七纳米颗粒对颅脑损伤后大鼠不同时点
血清肿瘤坏死因子-α 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$) ng·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TNF-α		
		伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 5 d
空白对照	-	0.92 ± 0.23	1.03 ± 0.29	1.05 ± 0.31
创伤模型	-	1.98 ± 0.36 ¹⁾	2.87 ± 0.41 ¹⁾	2.13 ± 0.40 ¹⁾
三七纳米	0.6	1.48 ± 0.50 ²⁾	1.93 ± 0.51 ²⁾	1.66 ± 0.47 ²⁾
	2.4	1.33 ± 0.47 ²⁾	1.89 ± 0.45 ²⁾	1.57 ± 0.43 ²⁾

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.05$;与创伤模型组相比²⁾ $P < 0.05$ 。

3.5 不同时点 IL-6 的变化 与空白对照组比,创伤模型组 IL-6 含量伤后 1 d 明显升高,3 d 达高峰、5 d 仍明显升高;与模型组相比,复方三七纳米颗粒高、低剂量组 IL-6 含量在伤后 1 d 明显降低,3 d 达高峰、5 d 仍明显减少($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 复方三七纳米颗粒对颅脑损伤后大鼠不同
时点血清 IL-6 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$) ng·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-6 含量		
		伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 5 d
空白对照	-	32.07 ± 9.04	32.91 ± 9.04	32.07 ± 9.32
创伤模型	-	66.89 ± 13.17 ¹⁾	71.09 ± 13.41 ¹⁾	69.39 ± 12.36 ¹⁾
三七 纳米	0.6	48.94 ± 13.27 ²⁾	42.93 ± 13.77 ²⁾	41.86 ± 13.07 ²⁾
	2.4	46.28 ± 11.75 ²⁾	42.38 ± 12.87 ²⁾	41.13 ± 12.09 ²⁾

4 讨论

复方三七纳米颗粒剂由三七、红参、琥珀等药物组成,其中所含的主要成分为三七三醇总苷(PTS)。三七具有活血化瘀、增加脑血管血流量,扩张血管,抗血小板聚集,抗炎,改善血液流变及微循环等作用^[6]。另外,三七皂苷可减轻脑梗死患者钙超载、减轻脑水肿、促进再灌注时的神经修复、减轻超微结构损伤和降低缺血再灌注期间死亡率^[7]。研究证实脑损伤后,在一些细胞因子的刺激下(如 TNF- α , IL-8, IL-6),大量中性粒细胞和单核细胞的聚集和浸润,导致血脑屏障的破坏,引起脑组织水肿及神经细胞的变性坏死。血脑屏障受破坏,血浆蛋白质、水分、钠等外渗进入脑组织形成血管源性脑水肿,可导致颅内压升高甚至脑疝形成^[8]。本次试验的结果中,使用复方三七纳米颗粒后神经细胞形态恢复,细胞器基本规则,血管内皮结构改善,基膜厚薄均匀,神经功能缺损症状明显恢复;脑组织含水量进一步减轻。研究认为其保护作用是对抗去甲肾上腺素使脑血管收缩,改善脑血流量及微循环从而改善脑水肿,促进神经功能恢复。

TNF- α 是一种具有广泛生物学功能的炎性细胞因子,是众多细胞因子的重要启动因子。主要由单核巨噬细胞产生,具有多种生物效应,浓度低时有免疫调节作用,浓度过高时则导致病理损伤。Feuerstein 等将 TNF- α 直接注入脑实质,发现毛细血管内皮细胞损伤,血管周围水肿形成和白细胞黏附于毛细血管^[9]。TNF- α 能诱导 IL-2 及 IL-6 的产生,并通过这些介质影响几乎所有的免疫细胞、内皮细胞,参与炎症反应和组织损伤^[10]。IL-6 是一个重要的促炎因子,可作用于多种靶细胞,通过调控成熟炎性细胞功能成分发挥刺激炎症的作用。多种有核细胞都可产生 IL-6,如 B 细胞、T 细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞等。IL-6 除由细胞合成外,部分细胞因子如 TNF- α , IL-1 等都能诱导它的合成。IL-6 介导的炎症反应在颅脑损伤中扮演着重要角色,Marklund^[11]认为白介素-6 在损伤发生后即刻就上升,而且损伤程度越重,IL-6 的水平越高。有研究证明:向脑室内注入重组 IL-6 能显著减轻局灶性脑缺血所致的大鼠脑缺血损伤,并认为内源性 IL-6 生物活性在脑缺血中反应性大量增高及外源性 IL-6 显著的神经元保护作用均提示 IL-6 是脑缺血神经元死亡的一种重要内生拮抗剂。也有研究表明^[12],三七能调节细胞因子网络,抑制酒精性肝病模型大鼠血清 TNF- α , IL-6, IL-8 的生成。本实验结果显示,复

方三七纳米颗粒可降低颅脑损伤大鼠血清各时间点的 TNF- α 和 IL-6,证明其抑制了炎症反应,减少了炎症因子的聚集和浸润,降低血管通透性和减少血浆蛋白渗出,从而减轻脑水肿,改善神经功能,从而起到脑保护的作用。

总之,本实验证实复方三七纳米颗粒可抑制弥漫性脑创伤后血脑屏障通透性,减轻脑水肿,促进神经功能的恢复,为临床脑创伤的治疗提供药物选择的新思路。

[参考文献]

- [1] 沈斌,杭春华. 炎性细胞因子在脑外伤继发性脑损害中的作用及研究进展[J]. 医学综述, 2011, 17(11):1621.
- [2] Baidwin S A, Fugaccia I, Brown D R, et al. Blood-brain barrier breach following cortical contusion in the rat[J]. J Neurosurg, 1996, 85:476.
- [3] Duvdevani R, Roof R L, Fulop Z, et al. Blood-brain barrier breakdown and edma formation following frontal cortical contusion; dose hor-monol status play a role[J]. J Neurotrauma, 1995, 12:65.
- [4] 高燕,孙俊谟,田志雄,等. 大鼠自由落体脑外伤模型的制作[J]. 浙江创伤外科, 2004, 9(10):283.
- [5] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社, 1991:38.
- [6] 侯安全. 三七的临床运用和实验研究概要[J]. 中医药信息, 1999, 6(1):21.
- [7] 吴兰鸥,詹合琴,闫俊岭. 三七皂苷 Rg1 对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用及机制探讨[J]. 中草药, 2006, 37(2):229.
- [8] 郝延磊,蒲传强,朱克,等. 血脑屏障内皮细胞与细胞间粘附分子-1 在鼠脑缺血性脑水肿发生机制中的作用[J]. 中华神经科杂志, 2000, 33(2):86.
- [9] Strauer B, Komowski R. Stem cell therapy in perspective[J]. Circulation, 2003, 107(7):929.
- [10] 玛斌,韩树生,王丽萍,等. 急性颅脑损伤患者 TNF- α , ET 及 CGRP 含量变化及意义[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2007(6):520.
- [11] Marklund N, Keck C, Hoover R, et al. Administration of mono-clonal antibodies neutralizing the inflammatory mediators tumornecrosis factor alpha and interleukin-6 does not attenuate acute behavioral deficits following experimental traumatic brain injury in therat[J]. Restor Neurol Neurosci, 2005, 23(1):31.
- [12] 刘庆生,蔡丹莉,张洁,等. 三七对酒精性肝病大鼠血清 TNF- α , IL-6, IL-8 水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009, 28(2):319.

[责任编辑 聂淑琴]