

血必净注射液对宫内感染致早产脑损伤仔鼠脑 TNF- α 和 GFAP 表达的影响

马丙祥^{1,2*}, 党伟利¹

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2. 南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] 目的: 观察血必净注射液对宫内感染致早产脑损伤仔鼠脑组织肿瘤坏死因子(TNF- α)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达的影响。方法: ① 12 只孕第 16 天脂多糖(LPS)组大鼠予 LPS 450 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip, 连续 2 d, 8 只生理盐水组孕鼠等量生理盐水 ip。孕 22 d 前分娩的仔鼠为早产仔鼠。随机选取生理盐水组足月产仔鼠 8 只作为空白对照组和 LPS 组早产仔鼠 24 只。LPS 组仔鼠随机分为 3 组, 每组 8 只, 分别为血必净高、低剂量(4, 2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组, 模型组。7 日龄时开始分别给予血必净注射液或生理盐水, ip, 共 14 d。② 21 日龄时对 4 组大鼠进行神经行为学检测(悬吊试验), 并取脑组织, 用免疫组化方法测定 GFAP, TNF- α 水平。结果: 与模型组比较, 血必净注射液高、低剂量组干预治疗后脑损伤仔鼠行为学方面得到改善($P < 0.05$); 与模型组比较, 血必净注射液高、低剂量组干预治疗后, 早产脑损伤仔鼠脑组织 TNF- α 阳性表达减少而 GFAP 阳性表达增加($P < 0.05$)。结论: 化瘀解毒中药血必净注射液可改善宫内感染所致早产脑损伤, 其作用机制可能与降低脑组织 TNF- α 表达和使 GFAP 表达升高有关。

[关键词] 脑性瘫痪; 宫内感染; 脑白质损伤; 胶质纤维酸性蛋白; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0272-04

[doi] 10.11653/syfy2013150272

Influence of Xuebijing Injection on Expression of GFAP and TNF- α During Cerebral Damage in the Prematured Neonatal Rat Induced by Intrauterine Infection

MA Bing-xiang^{1,2*}, DANG Wei-li¹

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;
2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of Xuebijing injection on expression of glial fibrillary acidic

[收稿日期] 20120728(006)

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2010B360011)

[通讯作者] * 马丙祥, 在读博士, 教授, 从事小儿神经系统疾病防治工作, Tel: 0371-66211081, E-mail: mbx1963@126.com

- [6] Anke Buchholz, Christine Laskov, Stefan B. Haderlein. Effects of zwitterionic buffers on sorption of ferrous iron at goethite and its oxidation by CCl_4 [J]. Environ Sci Technol, 2011, 45(8): 3355.
- [7] San-Qiang Li, Hong-Ye Meng, Shou-Min Xi, et al. The effect of CCl_4 -induced acute liver injury on the ADAM8 expression in the mice [C]. ICBE '12 Proceedings of the 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology, 2012, 23(7): 589
- [8] 赵艳玲, 蔡光明, 刘军, 等. 正交试验法优选小鼠四氯化碳肝损伤模型 [J]. 解放军药理学学报, 2011, 17(4): 215.
- [9] 郭又嘉, 蒙明瑜, 焦扬, 等. 玉郎伞黄酮对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 198.
- [10] 刘协, 顾呈华, 胡启之, 等. 甘草甜素脂质体对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(36): 8260.

[责任编辑 李玉洁]

protein (GFAP) and tumour necrosis factor- α (TNF- α) during lipopolysaccharide-induced white matter damage in the prematured neonatal rat induced by intrauterine infection. **Method:** Twelve rats with pregnancy duration of 16 days were intra-peritoneally injected LPS $450 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 2 day, and another 8 similar rats were injected with normal saline as the controls. The premature delivery was defined as a delivery before 22 days of pregnancy. Eight normal born rats from the controls were selected as the blank control group, and 24 premature delivered rats induced by LPS were selected as the models. The models were then divided into 3 groups: the model group, Xuebijing $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and Xuebijing $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ group, ip, for 14 d. The neurobehavior of rat was observed by suspension test. The expression of GFAP and TNF- α were detected in brain sections by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the Blank model control, Xuebijing low dose and high dose could improve the neurobehavior in rats ($P < 0.05$); Compared with the model control group, expression of TNF- α was decreased and GFAP was increased in both dose groups of Xuebijing ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xuebijing injection can treat intrauterine infection-induced white matter damage in the prematured neonatal rat, the mechanism may be related to removal of TNF- α expression and increase in GFAP expression.

[**Key words**] cerebral palsy; intrauterine infection; white matter damage; GFAP; TNF- α

血必净注射液是以古方血府逐瘀汤为基础的静脉制剂,有清热凉血、化瘀解毒^[1]之功效,鉴于临床实践中从毒、瘀论治宫内感染病因导致的脑损伤取得较好疗效,针对其主要病机,本实验制造宫内感染早产脑损伤动物模型,检测血必净注射液对宫内感染致早产脑损伤仔鼠脑肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达的影响。

1 材料

1.1 动物 清洁级成熟 Wistar 大鼠雌性 20 只和雄性大鼠 10 只,质量 260 ~ 350 g,由河南郑州大学动物实验中心提供,动物许可证号 0009792。饲养于河南中医学院第一附属医院中心实验室恒温恒湿动物房,明暗交替时间为 12 h,动物可自由饮食。

1.2 药品和试剂 血必净注射液(天津红日药业,批号 08081901),由赤芍、丹参、当归、红花、川芎组成,含生药 $500 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,单味中药含生药 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。脂多糖(LPS 血清型 055:B5,美国 Sigma 公司,批号 080108);兔抗人 GFAP 多克隆抗体(美国 Zymed 公司,批号 CB8398763);TNF- α 抗体(武汉博士德生物工程公司,批号 BA0131)。

1.3 仪器 DMIL 倒置显微镜(德国徕卡),BX41-32P0 生物显微镜(日本奥林巴斯),Thermo3111 水套式 CO₂ 培养箱(美国热电),自动包埋机 EG1150(德国徕卡),轮转式石蜡切片机 RM2245(德国徕卡),摊烤片机 KT-218IV(湖北太维),摊片机 HII22(上海徕卡),烘片机 HII22(上海徕卡)。

2 方法

2.1 模型的制备^[3]与分组 将大鼠常规饲养,自由饮食,室温 21 °C 左右。环境适应 1 周后,于下午

17 时以 2:1 合笼,次日上午 8 时查阴道脱落细胞涂片,以查得精子为孕第 0 天,孕鼠另笼饲养。

将受孕的大鼠根据随机数字表随机分为 LPS 组(12 只)和对照组(8 只)。孕第 16 天的 LPS 组孕鼠予 LPS $450 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip,连续 2 d,对照组孕鼠等量生理盐水 ip。记录两组大鼠的分娩时间及新生鼠出生体重。孕 22 d 前分娩的仔鼠为早产鼠。

2.2 模型病理学检测 仔鼠出生后即刻随机选 LPS 组和对照组孕鼠各 2 只,取子宫和胎盘,HE 染色,观察宫内感染情况,判断标准为大量中性粒细胞浸润。随机选 LPS 组和对照组仔鼠各 8 只,于冰盒上断头取脑,剥去去除粗大血管,冷生理盐水冲洗数次,滤纸吸干,取一侧脑组织于耳间线前 2 mm 水平行冠状切片,置 10% 中性甲醛中固定。常规 HE 染色,光镜下观察脑室旁白质损伤情况。

2.3 药物干预 随机选取生理盐水组足月产仔鼠 8 只作为空白对照组和 LPS 组早产仔鼠 24 只。LPS 组仔鼠随机分为 3 组,每组 8 只,分别为:血必净注射液 $4, 2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组,模型组。大鼠恒温恒湿,母乳喂养,自 7 日龄开始 ip 给药,模型组和空白对照组生理盐水 ip,连续 14 d。

2.4 仔鼠行为学检测 21 日龄时对 4 组大鼠进行神经行为学检测采用悬吊试验:使大鼠前腿抓住距离桌面 45 cm 水平玻璃棒(直径 0.5 cm),记录大鼠掉下的时间,并进行评分比较。评分标准:1 分: < 10 s; 2 分: 10 ~ 30 s; 3 分: 30 s ~ 2 min; 4 分: 2 ~ 5 min; 5 分: > 5 min。

2.5 仔鼠脑组织中 GFAP, TNF- α 水平检测 用免疫组化法测定。于生后 21 d,分别将 4 组仔鼠于冰

盒上断头取脑,剥离去除粗大血管,冷生理盐水冲洗数次,滤纸吸干,取一侧脑组织于耳间线前 2 mm 水平行冠状切片,置于 10% 中性甲醛中固定。组织常规脱水、固定制片,切片厚度 4 μm 。胞浆内染色为棕黄色放射状突起 GFAP 阳性细胞;TNF- α 阳性信号为胞浆呈棕黄色。进行 HE 染色和免疫组化染色。按免疫组化试剂盒说明进行。计数 GFAP 阳性细胞^[4]:选脑室旁白质部位,400 倍视野下计数每 0.1 mm \times 1 mm 面积下阳性细胞数,每张切片计数 4 个视野,取均值;TNF- α 蛋白采用美国 Image-Pro Plus 软件对免疫组化染色图片进行吸光度(A)测定,取均值。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,二样本均数比较采用独立样本 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 孕鼠分娩时间及仔鼠一般情况 宫内感染后孕鼠大多出现早产,娩出活产仔鼠数目少,体重低,体质差。见表 1。

表 1 脂多糖对孕鼠活产仔鼠数及仔鼠出生体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 / $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 活产仔鼠数 /只 | 仔鼠出生体重 /g |
|---------|--|-------------------------------|-------------------------------|
| 对照(足月) | 450 | 8.13 \pm 0.83 | 6.25 \pm 0.88 |
| LPS(早产) | 450 | 5.63 \pm 0.74 ¹⁾ | 4.75 \pm 0.70 ²⁾ |

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 孕鼠子宫及胎盘和新生仔鼠脑组织病理学检测 子宫和胎盘有大量中性粒细胞浸润,仔鼠脑组织形态学改变为脑白质结构疏松、胶质细胞聚集、尚有脑室内出血,符合宫内感染致早产脑损伤病理学改变,说明宫内感染致早产脑损伤动物模型造模成功。

3.3 行为学测试 与空白对照组比较,模型组仔鼠反应迟钝、稳定性差,悬吊时肢体自主活动明显减少,下肢易颤抖,掉落到桌上;血必净注射液高[(2.38 \pm 0.51)分]、低剂量组[(2.25 \pm 0.46)分]干预治疗后行为学评分分别为(2.38 \pm 0.51), (2.25 \pm 0.46)分,介于模型组[(1.63 \pm 0.51)分]与空白对照组[(3.25 \pm 0.70)分]之间($P < 0.05$),说明血必净注射液高、低剂量组可使宫内感染致早产脑损伤仔鼠行为学方面得到改善。高、低剂量之间差异无显著意义,作用相当。

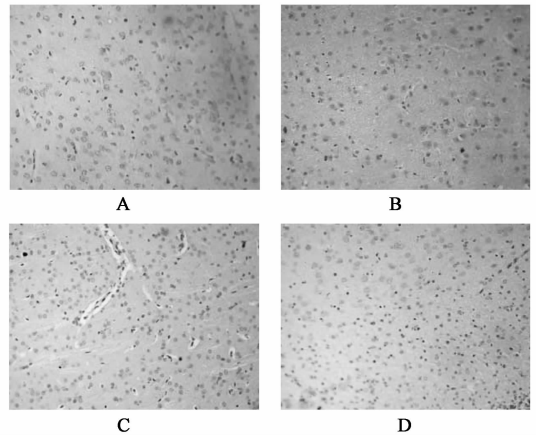
3.4 对仔鼠脑组织 TNF- α , GFAP 水平的影响 血

必净注射液高、低剂量组脑室旁白质中 TNF- α 水平近似,明显低于模型组($P < 0.05$),说明血必净注射液高、低剂量组可使对脑白质具有毒性的 TNF- α 含量下降,防止其对脑白质的进一步损害,提示干预治疗有效;高、低剂量组比较,TNF- α 含量无显著差异,见表 2,图 1。血必净注射液高、低剂量组脑室旁白质中 GFAP 阳性细胞数相近且明显高于模型组($P < 0.05$),说明血必净注射液干预治疗可使具有保护和修复作用的 GFAP 阳性细胞数明显增高,改善宫内感染所致的早产脑损伤,干预治疗有效;高、低剂量组比较,无统计学差异。见表 2,图 2。

表 2 血必净注射液对仔鼠脑组织 TNF- α , GFAP 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | TNF- α /A | GFAP /个 |
|--------|---|---------------------------------|---------------------------------|
| 对照 | - | 0.17 \pm 0.04 ⁴⁾ | 3.25 \pm 1.39 ³⁾ |
| 模型 | - | 0.28 \pm 0.02 ²⁾ | 5.50 \pm 1.93 ¹⁾ |
| 血必净注射液 | 4 | 0.24 \pm 0.04 ^{2,3)} | 8.38 \pm 1.92 ^{2,4)} |
| | 2 | 0.23 \pm 0.05 ^{2,3)} | 7.63 \pm 2.50 ^{2,3)} |

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。



A: 对照组; B: 模型组;

C: 血必净注射液 2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D: 血必净注射液 4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 血必净注射液对脑室旁白质 TNF- α 水平的影响(免疫组化, $\times 200$)

4 讨论

围生期孕母宫内感染是导致早产儿脑白质损伤发生的重要原因,而新生儿脑白质损伤是脑瘫发生的最重要的危险因素^[5]。Mazaki-Tovi S 等发现宫内感染期间,孕母体内炎症因子 TNF 和白细胞介素 6 水平明显上升,影响了早期胚胎神经系统发育^[6]。TNF- α 可通过诱导其他炎性因子和细胞毒介质促进白细胞聚集、黏附因子表达、影响胶质细胞的表达而

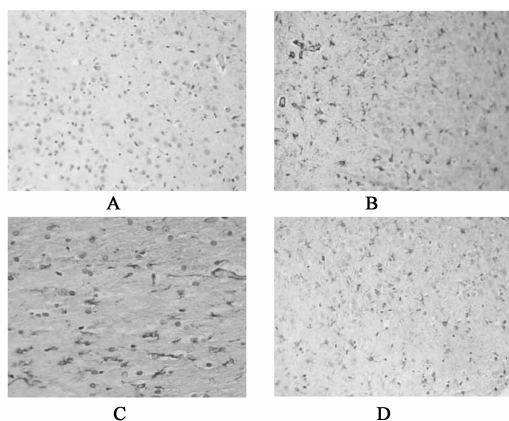


图2 血必净注射液对脑室旁白质 GFAP 水平的影响(免疫组化, $\times 200$)

参与中枢神经系统损伤,提示母体宫内感染后引起体内细胞因子的激活与释放,细胞因子网络反应可能是宫内感染后发生脑白质损伤的主要机制。GFAP 是星形胶质细胞^[7]主要成分,可作为星形胶质细胞特异性标记物,其增加对脑损伤起保护和修复作用。

宫内感染在中医病因学中属于“毒邪”。脑以精血为体,阳气为用,共同构成神明功能的物质基础,母孕之初感受毒邪,内舍胎儿,毒邪侵犯,导致气血津液运行不畅,阻于脉络,可形成瘀血;瘀血阻滞脑窍、累积蕴化日久则可内生为毒。毒瘀胶着,脑络损伤,脑髓破坏则神明失主、肢体失用、临床上可出现健忘失聪、反应迟钝、抽搐、语言蹇涩、斜视、肢体僵硬、屈伸不利、动作迟缓、活动不灵、运动障碍、舌质暗或有瘀点、指纹紫等证。

临床多数脑性瘫痪患儿有新生儿产伤史,颅内出血史及脑缺血缺氧病史,或母孕期宫内感染或胎盘异常,脐带异常等病因,以上因素均可导致瘀血内阻,气机不通,脑窍不开,经络阻滞,筋脉失养,继而导致运动障碍继而导致运动障碍、姿势异常等脑性瘫痪的临床表现,研究表明脑性瘫痪患儿的血小板计数较正常健康儿童高^[8],这也反映出脑瘫“瘀”的特点。

本实验证实化瘀解毒中药血必净注射液^[9-10]干预治疗后,宫内感染致早产脑损伤仔鼠脑 TNF- α 表达降低、GFAP 表达增高,改善脑损伤。其可能机制为:降低宫内感染导致的炎症反应,阻断其激活发育中的星形细胞和小胶质细胞,从而抑制多种细胞因子产生,阻断和由血液中渗入的白细胞一起对这些细胞因子产生应答,进而减少脑白质组织中的星形

细胞及轴突等损伤。GFAP 表达增高表明脑损伤后星形胶质细胞活化增生,血必净注射液可干预其活化状态,促进胶质化形成,在脑损伤修复中起到了一定的作用,可能是其治疗脑损伤重要机制之一。因此对宫内感染致早产脑损伤的患儿及时应用化瘀解毒中药可清除及抑制这些有毒物质及瘀血,阻断毒瘀互化的恶性循环链,提高疗效和改善预后。

[参考文献]

[1] 滕寅,肖家荣,林鹏,等. 血必净注射液对重症肺炎患者细胞免疫及炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):295.

[2] 唐良法. 血必净对慢性肺心病急性加重期血气分析和心功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):299.

[3] 李晓捷,高晶,孙忠人. 宫内感染致早产鼠脑瘫动物模型制备及其鉴定的实验研究[J]. 中国康复医学杂志,2004,19(12):885.

[4] Kitagawa K, Matsumoto M, Ohtsuki T, et al. Extended neuronal protection induced after sublethal ischemia adjacent to the area with delayed neuronal death[J]. Neuroscience,2000,96(1):141.

[5] Leviton A, Allred E N, Kuban K. Microbiologic and histologic characteristics of the extremely preterm infant's placenta predict white matter damage and later cerebral palsy[J]. Pediatric Research,2010,67(1):95.

[6] Mazaki-Tovi S, Romero R, Kusanovic J P, et al. Visfatin/Pre-B cell colony-enhancing factor in amniotic fluid in normal pregnancy, spontaneous labor at term, preterm labor and prelabor rupture of membranes: an association with subclinical intrauterine infection in preterm parturition [J]. Perinat Med, 2008, 36(6):485.

[7] 董小平,喻斌,金路,等. 血脑屏障细胞组成研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):281.

[8] 张杰磊,冯刚. 脑瘫儿童和健康儿童血小板计数的临床对比观察[J]. 中国康复理论与实践,2006,10(12):846.

[9] 陈立朋,龙会宝,吴娟环,等. 血必净注射液治疗脓毒症临床研究[J]. 岭南急诊医学杂志,2011,16(5):335.

[10] 苏伟,杨智,王思荣,等. 血必净注射液对重症脓毒症患者机体炎症反应和细胞免疫功能的影响[J]. 中国医师进修杂志,2012,35(1):29.

[责任编辑 李玉洁]