

• 论著 •

参麦注射液对外伤性脑损伤大鼠神经元细胞的保护作用

白 玉, 张圣埭, 王良荣, 赵喜悦, 林丽娜

(温州医学院第一附属医院麻醉科, 浙江 温州 325000)

【摘要】 目的 探讨参麦注射液对外伤性脑损伤的保护机制。方法 按随机数字表法将 72 只雄性 SD 大鼠分为假手术组、模型组、参麦治疗组, 每组 24 只。采用改良 Freeney 法制作外伤性脑损伤大鼠模型; 假手术组单纯开骨窗不损伤脑组织。参麦治疗组于伤后 1 h 单次腹腔注射参麦注射液 15 ml/kg; 模型组给予等量生理盐水。伤后 6、10、24 及 72 h 检测血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)水平, 同时观察脑组织病理改变, 于 24 h 观察大鼠平衡木实验(BBT)评分。结果 光镜下观察假手术组各时间点脑组织结构正常, 无出血、水肿及损伤; 与模型组相比, 参麦治疗组大鼠损伤灶周围脑细胞缺氧、水肿损伤程度及损伤范围均有明显改善。与假手术组比较, 模型组和参麦治疗组早期 NSE 含量显著升高, 均于伤后 6 h 达峰值[(51.33±5.70) μg/L、(43.41±5.21) μg/L 比(14.33±3.26) μg/L, 均 $P<0.01$], 72 h 基本恢复; SOD 活性显著下降, 均于伤后 24 h 达谷值[(179.34±5.14) kU/L、(192.60±6.57) kU/L 比(205.23±8.08) kU/L, $P<0.01$ 和 $P<0.05$]。与模型组比较, 参麦治疗组各时间点 NSE 含量下降, SOD 活性升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组各时间点间 MDA 含量均无明显变化。参麦治疗组 BBT 评分较模型组增高[(2.250±0.420) 分比(1.875±0.440) 分], 但差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 增强 SOD 活性、减少 NSE 产生、保护神经元细胞可能是参麦注射液保护外伤性脑损伤的作用机制。

【关键词】 脑损伤, 外伤性; 神经元特异性烯醇化酶; 超氧化物歧化酶; 参麦注射液

中图分类号: R285.5; R651.15 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.01.009

Protection of Shenmai injection (参麦注射液) on neuron cells in rats following traumatic brain injury BAI Yu, ZHANG Sheng-gong, WANG Liang-rong, ZHAO Xi-yue, LIN Li-na. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China
Corresponding author: LIN Li-na, Email: wzlinlina@tom.com

【Abstract】 Objective To investigate the protection of Shenmai injection (参麦注射液) in rats following traumatic brain injury (TBI). Methods Seventy-two Sprague-Dawley (SD) male rats were divided into three groups by random digits table method (each $n=24$): the sham operation, the model and the Shenmai injection-treated groups. The latter two groups received free fall injury in the cerebral hemisphere (Freeney method). The Shenmai injection treated-group received once of intra-peritoneal Shenmai injection (15 ml/kg), and the model group, the same route and dose of isotonic sodium chloride at 1 hour post-injury. A piece of skull was taken away in the sham operation group without cerebral injury. The levels of serum neuron specific enolase (NSE), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured at 6, 10, 24, 72 hours after TBI, and in the mean time, the pathological changes of brain tissues were observed. The ability of coordinating muscle movement and keeping balance in rats was assessed at 24 hours. Results Under light microscope, the structure of brain tissue was normal and there were no hemorrhage, edema and injury at various time points in the sham operation group; in comparison with the model group, the hypoxia, edema and the area of injury of the brain cells around the focus of injury were significantly improved in the Shenmai injection treated-group. Compared with the sham operation group, the levels of NSE in the model and the Shenmai injection-treated groups were increased significantly with a peak at 6 hours [(51.33±5.70) μg/L, (43.41±5.21) μg/L vs. (14.33±3.26) μg/L, both $P<0.01$] and they returned basically to the baseline level at 72 hours after TBI. The activities of SOD were remarkably reduced with a valley at 24 hours [(179.34±5.14) kU/L, (192.60±6.57) kU/L vs. (205.23±8.08) kU/L, $P<0.01$ and $P<0.05$]. Compared with the model group, the level of NSE was lower, the activity of SOD was higher in the Shenmai injection-treated group at various time points ($P<0.05$ or $P<0.01$). Throughout this study, no statistical significant changes of MDA in the three groups were observed. The score of balancing beam test (BBT) was higher in the Shenmai injection-treated group (2.250±0.420) than that in the model group (1.875±0.440), but there was no statistical significant difference ($P>0.05$). Conclusion Enhancing the activity of SOD and inhibiting the production of NSE are possibly the mechanisms of Shenmai injection in protecting neuron cells in rats following TBI.

【Key words】 Traumatic brain injury; Neuron specific enolase; Superoxide dismutase; Shenmai injection

参麦注射液是由人参、麦冬组成的中药注射剂,

具有益气固脱、养阴生津、生脉之功效, 目前已广泛应用于心血管、呼吸系统疾病的治疗, 在脑缺血/再灌注(I/R)损伤、脑出血、脑梗死疾病中对脑组织也有不同程度的保护作用^[1-2]。神经元特异性烯醇化酶

基金项目: 浙江省中医药科技基金资助项目(2007CA086)

通信作者: 林丽娜, Email: wzlinlina@tom.com

作者简介: 白玉(1982-), 女(汉族), 河南省人, 硕士研究生。

(NSE)是神经元损伤的最敏感生化指标,其水平变化能够反映神经元的损伤程度^[3-4]。有研究证实,超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)在外伤性脑损伤(TBI)的病情发展及预后中起着重要作用^[5]。本研究中采用经典 TBI 模型(改良 Freeney 自由落体法),动态观察大鼠 TBI 后血清 NSE、SOD、MDA 含量的变化及神经行为学的改变,初步探讨大鼠 TBI 后早期单次腹腔注射参麦注射液的干预效果,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及模型制备:雄性 SD 大鼠 72 只(由上海斯莱克实验动物中心提供),体重 280~300 g。按随机数字表法分为假手术组、模型组、参麦治疗组,每组 24 只。用改良的 Freeney 法^[6]制作大鼠左顶叶局限性脑挫裂伤模型。假手术组仅切开头皮行颅骨钻孔而不致伤脑组织。参麦治疗组于伤后 1 h 单次腹腔注射 15 ml/kg 参麦注射液(雅安三九药业有限公司,批号:070901),模型组注射等量生理盐水。各组分别于伤后 6、10、24 和 72 h 取大鼠颈总动脉血 3 ml,低温下保存备测 NSE、SOD、MDA 水平;取血后断头处死大鼠,取损伤灶脑组织用于组织病理观察。

1.2 检测指标及方法:常规制备脑组织冠状切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察组织病理变化。用双抗体夹心 ABC 酶联免疫吸附法(ELISA)测定 NSE(试剂盒购于美国 R&D 公司);硫代巴比妥酸法测定 MDA,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD(试剂盒购于南京建成生物工程研究所);操作均按试剂盒说明书步骤进行。

1.3 平衡木实验(BBT)^[7]:观察伤后大鼠协调肌肉运动以保持平衡的能力,于 24 h 时进行 BBT 评分。

1.4 统计学处理:采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组样本均数比较进行方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐者两两比较用 LSD 法,方差不齐者进行 Dunnet *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清 NSE、SOD 及 MDA 水平(表 1):与假手术组比较,模型组和参麦治疗组 6、10、24 h NSE 含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),72 h 时基本恢复至假手术组水平;各时间点 SOD 活性显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);MDA 含量均有不同程度增加,但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与模型组

比较,参麦治疗组 6、10、24 h NSE 含量均明显降低,各时间点 SOD 活性明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),MDA 含量亦有所下降,但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠 TBI 后各时间点血清 NSE、SOD、MDA 水平变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数	NSE($\mu\text{g/L}$)	SOD(kU/L)	MDA($\mu\text{mol/L}$)
假手术组	6 h	6	14.33±3.26	211.49±9.54	7.32±1.54
	10 h	6	12.33±2.67	210.05±10.92	7.10±1.09
	24 h	6	9.93±2.44	205.23±8.08	7.05±1.78
	72 h	6	9.02±2.52	211.69±8.11	7.48±1.26
模型组	6 h	6	51.33±5.70 ^b	187.02±7.59 ^b	7.71±2.15
	10 h	6	34.57±4.17 ^b	184.44±6.93 ^b	7.29±1.16
	24 h	6	21.88±5.11 ^b	179.34±5.14 ^b	7.92±2.12
	72 h	6	10.30±2.68	185.98±3.53 ^b	8.10±1.98
参麦治疗组	6 h	6	43.41±5.21 ^{bc}	199.13±7.61 ^{ac}	7.41±1.68
	10 h	6	28.17±4.91 ^{bc}	197.98±5.73 ^{ac}	7.25±1.48
	24 h	6	12.97±5.52 ^{ac}	192.60±6.57 ^{ad}	7.45±2.01
	72 h	6	9.37±1.91	196.06±7.99 ^{bc}	7.76±1.84

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组同期比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

2.2 神经行为学评定:假手术组大鼠均能在平衡木上保持约 60 s,并能在规定时间内顺利到达对面;而模型组和参麦治疗组大鼠无法完成。假手术组、模型组、参麦治疗组 BBT 评分分别为(3.875±0.140)、(1.875±0.440)、(2.250±0.420)分,但参麦治疗组与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 脑组织病理观察

2.3.1 大体观察:假手术组各时间点脑组织表面光滑,沟回整齐,无充血、水肿及出血灶;模型组损伤区脑皮质表面有挫裂伤及点片状出血灶,有充血、肿胀,伤后 24 h 和 72 h 损伤灶形成坏死空洞;参麦治疗组脑组织损伤区与模型组无明显差别。

2.3.2 光镜下观察(彩色插页图 1):假手术组各时间点脑组织结构及细胞均正常,蛛网膜下腔稍充血及少量炎性细胞浸润。模型组蛛网膜下腔出血,损伤区炎性细胞浸润,神经元细胞核浓缩、深染、固缩甚至溶解,胞质内容物减少,结构疏松,伴有细胞坏死、空泡变性;损伤灶周围脑组织疏松、出血、水肿、充血,损伤时间与损伤程度成正比,24 h 水肿达高峰,且损伤范围扩大至损伤灶下方白质,损伤灶组织坏死、形成空洞,周围大量炎性细胞浸润,胶质细胞增生明显,72 h 脑水肿程度减轻,组织坏死范围扩大,空洞边缘胶质细胞增生明显。参麦治疗组各时间点出现脑组织结构紊乱及局部出血、水肿、胞核固缩和炎性细胞浸润等现象,但较模型组对应时间点均有一定程度减轻。

3 讨论

TBI 后大鼠因脑缺血、缺氧和出血等因素刺激脑内氧自由基大量形成,而脑组织本身脂质丰富,抗氧化作用弱,易受氧自由基的攻击,导致脑损害的进一步加重^[8]。SOD 是体内重要的抗氧化活性酶。当脑组织病理性自由基大量生成时,自身防御反应消耗大量内源性 SOD,故模型组和参麦治疗组 SOD 活性明显减少;因自由基损伤线粒体膜,细胞能量代谢障碍,继续加重已被自由基损伤的神经元细胞膜。神经元细胞膜完整性的破坏使 NSE 从神经元内漏出至细胞间隙,通过已被破坏的血脑屏障进入血液,通过检测血中 NSE 水平可以作为判断脑损伤程度和预后的依据^[4,9-10]。本研究结果显示,模型组大鼠伤后 6 h 血清 NSE 含量较假手术组显著升高,与 Woertgen 等^[10]的研究结果相似;因为蛋白降解的作用,血清 NSE 含量升高,并在损伤 24 h 后慢慢恢复,72 h 时接近假手术组水平。

参麦注射液的有效成分为人参皂苷、麦冬皂苷、麦冬黄酮、人参多糖和麦冬多糖。研究证明,参麦注射液具有强心、升压、扩张冠状动脉、增加心肌供血、减少心肌耗氧量、消除氧自由基的作用^[11-12]。本研究结果表明,与模型组比较,参麦治疗组 SOD 活性明显增加,NSE 含量明显降低,其机制可能为参麦注射液能够清除脑组织氧自由基、降低脂质过氧化、增强 SOD 活性及稳定细胞膜,防护缺血、缺氧及再灌注时氧自由基和脂质过氧化物对神经元的损伤,提高神经元的耐缺氧能力及应激能力;亦可能通过维持线粒体膜稳定性,改善神经元细胞能量代谢,减轻钙离子超载而发挥抗凋亡作用以延缓脑水肿发展,在脑损伤早期充分发挥其益气固脱、养阴生津、补中寓通、扶正复脉的功效^[12-13]。本研究中脑组织 HE 染色结果也显示:参麦治疗组大鼠损伤灶周围脑细胞缺氧、水肿程度及损伤范围均较模型组有明显改善。

BBT 是目前公认较好的神经行为学评定方法之一,文献报道,脑损伤大鼠伤后 24 h 水肿达高峰,神经功能障碍最明显^[14]。前庭运动功能及机体平衡的正常维持依赖于本体感受器感觉信息的输入和锥体外系的整合及协调,前庭运动功能在神经元水平由皮质脊髓神经元、黑质-纹状体通路、伏隔核、基底

节和丘脑共同进行整合与传导,上述通路中任何一部分受损均可导致运动能力的缺陷^[7,15],而 TBI 引起的脑细胞损伤造成通路某些环节连接欠佳或中断而导致神经功能缺损症状。虽然本研究中参麦治疗组大鼠 BBT 评分与模型组相比无明显差异,但平衡能力及运动行为还是有所改善,原因可能与单次给予参麦注射液致治疗时间不足或单纯中药治疗有关,可考虑连续给药并延长治疗时间或采用中西医结合治疗。

参考文献

- [1] 苏耀中,郭晓宁.参麦注射液治疗慢性肺源性心脏病 53 例疗效观察.中国中西医结合急救杂志,2006,13(3):190.
- [2] 陈前芬,田鹤郎,杨卫东,等.参麦注射液对局灶性脑缺血再灌注局部脑血流和脂质过氧化的影响.中国病理生理杂志,1996,12(4):440-441.
- [3] Lima JE, Takayanagi OM, Garcia LV, et al. Neuron-specific enolase in patients with neurocysticercosis. J Neurol Sci, 2004, 217(1):31-35.
- [4] 王晓明,张国元,龙存国,等.同步测定血清神经元特异性烯醇化酶和髓鞘碱性蛋白含量对脑梗死及多发性硬化鉴别诊断的意义.中国危重病急救医学,2002,14(3):169.
- [5] 王卫民,姜自周,程军,等.选择性脑亚低温治疗重型颅脑损伤疗效的研究.中国危重病急救医学,2002,14(1):35-37.
- [6] Freeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. Brain Res, 1981, 211(1):67-77.
- [7] Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, et al. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. Neurosci Biobehav Rev, 2004, 28 (4):365-378.
- [8] Wu J, Hua Y, Keep RF, et al. Oxidative brain injury from extravasated erythrocytes after intracerebral hemorrhage. Brain Res, 2002, 953(1-2):45-52.
- [9] 缪文丽,李海玲,王弘道,等.神经元特异性烯醇化酶和 S100 蛋白评估心脏停搏患者复苏后脑损伤的研究.中国危重病急救医学,2007,19(12):749-752.
- [10] Woertgen C, Rothoerl RD, Brawanski A. Neuron-specific enolase serum levels after controlled cortical impact injury in the rat. J Neurotrauma, 2001, 18(5):569-573.
- [11] 李庆海,吕安清,张芳,等.参麦注射液对慢性充血性心力衰竭患者心率变异性的影响.中国中西医结合急救杂志,2000,7(5):273-275.
- [12] 李建生,赵君玫,郭盛典,等.川芎嗪和参麦注射液对脑缺血/再灌注损伤老龄大鼠心肌组织 ATP 酶和自由基代谢的影响.中国中西医结合急救杂志,2001,8(6):347-350.
- [13] 曹慧玲,吕士杰,蒋艳霞,等.急性肺损伤大鼠氧自由基变化及不同中药治疗作用的对比.中国中西医结合急救杂志,2006,13(3):146-149.
- [14] 王东岩,黄昕红,王岩,等.不同针刺时机促进急性脑损伤大鼠神经功能恢复的动态研究.中医药学报,2008,36(3):30-32.
- [15] Hamm RJ. Neurobehavioral assessment of outcome following traumatic brain injury in rats, an evaluation of selected measures. Neurotrauma, 2001, 18(11):1207-1216.

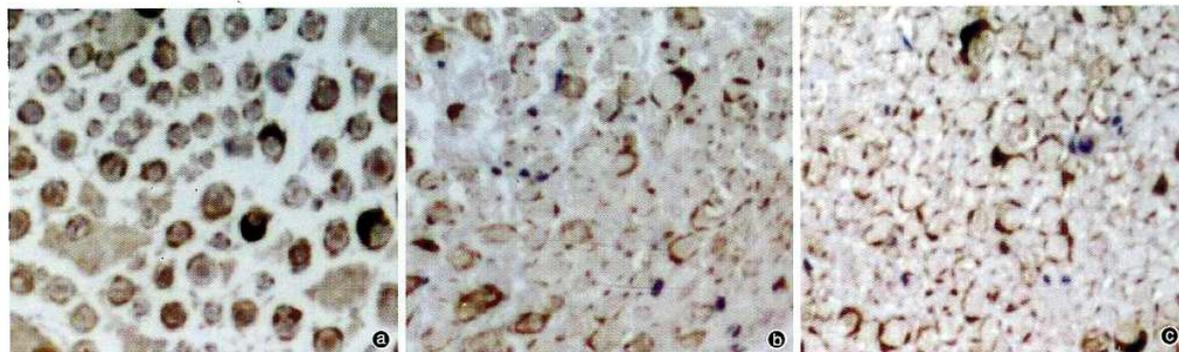
(收稿日期:2009-10-14)

(本文编辑:李银平)

祝贺我刊编委付小兵教授当选中国工程院院士
祝贺我刊编委付小兵院士、柴家科教授荣获 2009 年度“何梁何利奖”

中药筋脉通对糖尿病大鼠睫状体神经营养因子表达的影响

(正文见3页)

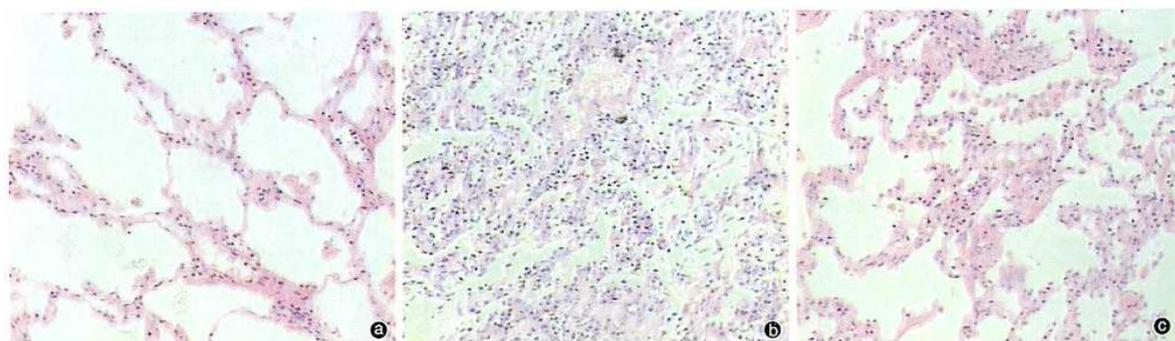


④:模型组, ⑤:筋脉通组, ⑥:神经妥乐平组

图1 各组大鼠坐骨神经睫状体神经营养因子的蛋白表达(免疫组化, ×200)

黄芪对兔肺缺血/再灌注损伤的保护作用

(正文见13页)

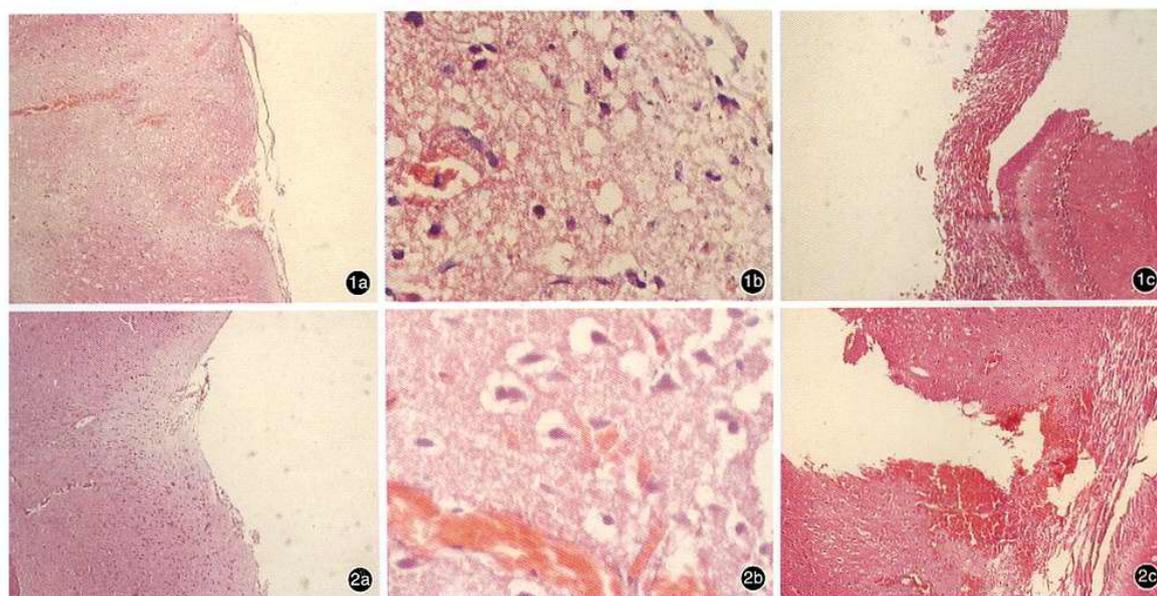


②:假手术组, ①:模型组, ③:黄芪组

图1 光镜下观察各组动物缺血/再灌注后肺组织病理改变(HE, ×20)

参麦注射液对外伤性脑损伤大鼠神经元细胞的保护作用

(正文见28页)



①:模型组, ②:参麦治疗组, ③~⑤:伤后10、24、72 h

图1 光镜下观察各组大鼠外伤性脑损伤后各时间点脑组织病理改变(HE, ×400)