

消脱止-M 对创伤性脑损伤后脑部微循环和神经功能的保护作用

赵丽, 孙圣凯, 侯志勇, 高培龙, 涂悦, 孙洪涛

(武警后勤学院附属医院, 天津 300162)

【摘要】 目的 探讨消脱止-M 对创伤性脑损伤(TBI)脑部微循环的保护作用及神经功能的影响。方法 将 52 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组($n=12$)、TBI 组($n=20$)和消脱止-M 组($n=20$)。采用动物液压冲击仪(2.0 atm, 1 atm=101.325 kPa)建立大鼠 TBI 模型,消脱止-M 组灌胃消脱止-M 30 mg/kg,假手术组和 TBI 组灌胃等量生理盐水,均连用 7 d。扫描电镜下观察大鼠脑部微循环结构的改变。术后 1、3、7 d 采用实时定量-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TBI 后脑部炎症细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及核转录因子- κ B(NF- κ B)基因表达;采用黄嘌呤氧化酶法测定脑组织与血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性。TBI 后 7 d 和 14 d 采用神经系统疾病严重程度评分(NSS)评价大鼠神经功能的改善状况。**结果** TBI 组大鼠脑血管水肿、神经元胞质和细胞器肿胀、溶解、消失,以及外周神经毡肿胀、电子密度降低;消脱止-M 组给药 7 d 后脑血管水肿和神经元细胞肿胀较 TBI 组有所缓解,电子密度也有所增加。与假手术组比较,TBI 组和消脱止-M 组脑组织 TNF- α 和 NF- κ B 基因表达水平明显上升,SOD 活性明显下降(均 $P<0.05$);与 TBI 组比较,消脱止-M 组大鼠脑部微循环明显改善,给药后 1 d 消脱止-M 组 TNF- α 、NF- κ B 基因表达水平即明显降低(TNF- α : 1.483 ± 0.062 比 2.231 ± 0.051 ; NF- κ B: 1.692 ± 0.063 比 2.250 ± 0.059 ,均 $P<0.05$),血清与脑组织 SOD (U/mg)活性即明显升高(血清: 213.37 ± 12.02 比 190.12 ± 6.73 ,脑组织: 211.56 ± 11.14 比 163.22 ± 14.32 ,均 $P<0.05$),给药后 7 d NSS (分)即明显降低(8.10 ± 0.35 比 9.30 ± 0.53 , $P<0.05$)。**结论** 消脱止-M 对大鼠 TBI 后的微循环结构有明显保护作用,且可促进神经功能的修复,其作用机制可能与炎症因子 TNF- α 、NF- κ B 基因表达下降及 SOD 上升相关。

【关键词】 创伤性脑损伤; 消脱止-M; 微循环; 炎症反应; 神经修复

The protective effects of melilotus extract tablet on neurological function and cerebral microcirculation after traumatic brain injury in rats ZHAN Li, SUN Sheng-kai, HOU Zhi-yong, GAO Pei-long, TU Yue, SUN Hong-tao. *Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China*
Corresponding author: GAO Pei-long, Email: paizi2001@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To explore the protective effects of melilotus extract tablet (MET) on cerebral microcirculation and neurological function after traumatic brain injury (TBI) in rats. **Methods** Fifty-two male SD rats were randomly divided into sham operation ($n=12$), TBI ($n=20$) and MET groups ($n=20$). The rat's TBI model was reproduced with fluid percussion (2.0 atm, 1 atm=101.325 kPa). After the establishment of TBI model, the rats in MET group were treated with MET (30 mg/kg) by gavage, while rats in sham operation and TBI groups were given the gavage of equal amount of normal saline for consecutive 7 days. The structure of rat cerebral microcirculation was observed by scanning electron microscope (SEM). On 1, 3 and 7 days after TBI, the mRNA expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in the brain were measured by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), and the activities of superoxide dismutase (SOD) in rat brain and serum were determined by xanthine oxidase method. The improvement of neurological function was evaluated by the modified neurological severity score (NSS) on the 7th and 14th day after TBI. **Results** The cerebral edema, the swelling of neuronal cytoplasm and organelles with their disappearance and dissolution, distension of peripheral neuropil and low density of the pathological area were more obvious in TBI group. Seven days later, the cerebral edema and neuronal swelling in MET group were milder than those in TBI group, and the electron density in the former group was also higher. Compared with sham operation group, the expressions of TNF- α and NF- κ B mRNA were significantly higher, whereas SOD level was markedly lower in TBI and MET groups (all $P<0.05$). Compared with TBI group, the improvement in cerebral microcirculation in MET group was obvious, one day after TBI, the expressions of mRNA TNF- α and NF- κ B were lowered significantly (TNF- α : 1.483 ± 0.062 vs. 2.231 ± 0.051 ; NF- κ B: 1.692 ± 0.063 vs. 2.250 ± 0.059 , all $P<0.05$), while the SOD (U/mg) levels in serum and brain were remarkably increased (serum: 213.37 ± 12.02 vs. 190.12 ± 6.73 ; brain: 211.56 ± 11.14 vs. 163.22 ± 14.32 , both $P<0.05$), and NSS score was much lower after 7 days' treatment in the MET group (8.10 ± 0.35 vs. 9.30 ± 0.53 , $P<0.05$). **Conclusion** It is shown that MET has an obvious protective effect on structure of cerebral microcirculation and can improve neurological function after TBI in rat brain, and the mechanism is possibly related to the down-regulation of mRNA TNF- α and NF- κ B and up-regulation of SOD.

【Key words】 Traumatic brain injury ; Melilotus extract tablet ; Microcirculation ; Inflammatory reaction ; Neurological repair

炎症细胞因子与在创伤性脑损伤 (TBI) 后的继发性损伤因素如血管源性脑水肿^[1-2]、血脑屏障破坏、氧化应激水平上升^[3-4]等有密切的关系。研究表明炎症反应参与了 TBI 的病理过程^[5]。以草木犀流浸液为主要成分的消脱止-M 片剂,通过减少炎症物质的释放、减轻毛细血管通透性和扩张血管,改善微循环,达到减少组织间隙渗出、抗水肿和消除水肿的目的^[6],目前该药物主要应用于痔疮等领域,主要机制是抑制炎症、水肿等。本实验根据我国制定的 TBI 标准^[7],采用液压冲击法建立 TBI 模型,观察消脱止-M 对 TBI 后脑部微循环的改变与促炎症因子肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 及核转录因子-κB (NF-κB) 基因表达的影响,探讨 TBI 后消脱止-M 对脑部微循环的影响及对神经功能修复的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器: MODEL01-B 液压颅脑损伤仪由美国弗吉尼亚大学医学院研制;实时定量聚合酶链反应 (PCR) 体系试剂盒购自美国 Applied Biosystems 公司;消脱止-M 购于日本大阪生晃营养药品株式会社;超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;钨灯丝扫描电子显微镜由德国卡尔蔡司公司生产。

1.2 动物分组及给药: 52 只雄性 SD 大鼠,月龄 3~4 个月,体质重 280~320 g。按随机数字表法分为假手术组 (n=12)、TBI 组 (n=20)、消脱止-M 组 (n=20)。采用液压打击仪制备 TBI 模型;假手术组仅切开头皮和开骨窗,不造成 TBI。动物模型复制:使用 6% 水合氯醛 (36 mg/kg) 麻醉大鼠后将其固定于立体定位仪上。消毒后,移除直径 4 mm 的颅骨 (前囟向右 4.0 mm、向后 2.7 mm),暴露硬脑膜,用液压冲击仪给予 2.0 atm (1 atm=101.325 kPa) 的冲击建立 TBI 模型。消脱止-M 组在制模后灌胃消脱止-M 30 mg/kg,每日 1 次,持续 7 d;假手术组和 TBI 组给予等量生理盐水灌胃。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 大鼠脑部结构改变: 于给药后 7 d 用 6% 水合氯醛麻醉大鼠,2.5% 戊二醛溶液灌流固定,4℃ 保存,扫描电镜下观察脑部血管、神经元等超微结构变化。

1.3.2 大鼠脑部 TNF-α 和 NF-κB 基因表达: 取血

后断头处死大鼠,取出大鼠脑标本,液氮冷冻保存。将 100 mg 脑组织放置于预冷的组织匀浆器研磨,用 TRIzol 1 ml 提取总 RNA,并测定浓度。采用 ABI 公司 7300 实时定量 PCR 系统 (美国) 测定基因表达。25 μl 的反转录混合物包括: 12.5 μl 2× SYBR Green I 染料,10 ng cDNA 模板,适量引物。TNF-α 引物序列: 上游 5'-CCCTCAGCAAGGACAGCAGA-3', 下游 5'-AGCCGTGGGTCAGTATGTGAGA-3'; NF-κB 引物序列: 上游 5'-CACTTATGGACAACACTATGAGGTCTCTGG-3', 下游 5'-CTGTCTTGTGGACAACGCAGT GGAATTTTAGG-3'; 内参照三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 引物序列: 上游 5'-TCCCTCAAGATTGTCA GCAA-3', 下游 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3', 扩增片段长度 303 bp。根据 Ct 值进行相对定量分析: $X_1/X_2 = 2^{\Delta Ct_2 - \Delta Ct_1}$ ($\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参照}$)。

1.3.3 血清与脑组织 SOD 活性测定: 心脏取血后断头处死大鼠,剥离脑组织制成匀浆。采用黄嘌呤氧化酶法检测血清和脑组织 SOD 活性,操作按试剂盒说明书要求,依照下列公式计算血清总 SOD 活性: 总 SOD 活性 = [对照管吸光度 (A) 值 - 测定管 A 值 / 对照管 A 值] / 50% × 反应体系的稀释倍数 × 样本检测前的稀释倍数。

1.3.4 神经功能损伤评价: 参照 Mahmood 等^[8]的方法,采用神经系统疾病严重程度评分 (NSS) 评价大鼠的神经功能。实验前按评价方法训练大鼠,选取评分为 0 的正常大鼠制模,于 7 d 和 14 d 进行评分,分值越低提示神经功能损伤的程度越严重。

1.4 统计学分析: 采用 SPSS 11.0 统计软件处理数据,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 ANOVA 方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

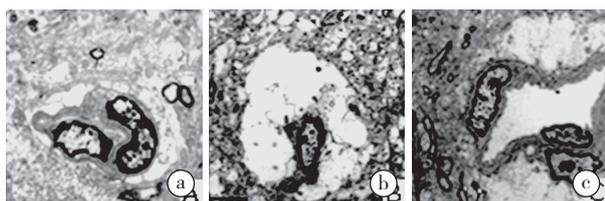
2 结果

2.1 各组炎症细胞因子 TNF-α 与 NF-κB 基因表达 (表 1): 与假手术组比较,制膜后 1、3 和 7 d TBI 组和消脱止-M 组 TNF-α、NF-κB 基因表达均明显升高 (均 P < 0.05); 与 TBI 组同期比较,消脱止-M 各时间点 TNF-α、NF-κB 基因表达则明显降低 (均 P < 0.05)。

2.2 各组大鼠血清和脑组织 SOD 水平比较 (表 1): 与假手术组比较,制膜后 1、3 和 7 d TBI 组和消脱止-M 组大鼠血清和脑组织 SOD 水平均显著降低

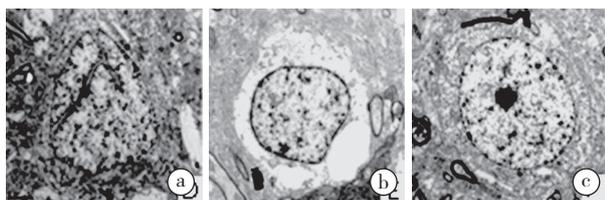
(均 $P < 0.05$); 与 TBI 组同期比较, 消脱止-M 组血清与脑组织 SOD 水平均明显升高 (均 $P < 0.05$)。

2.3 脑部血管及神经元细胞的变化 (图 1~2): 与假手术组比较, TBI 组制模 7 d 后脑血管水肿、神经元细胞胞质、细胞器及神经元细胞外周神经毡 (神经毡是由神经元细胞的轴突、树突、神经突触及星形胶质细胞胞质共同组成) 肿胀等超微结构的病理变化更明显, 电子密度更低; 消脱止-M 组给药 7 d 后脑血管水肿和神经元细胞肿胀较 TBI 组有所缓解, 电子密度也有所增加。



①: 假手术组; ②: TBI 组; ③: 消脱止-M 组

图 1 扫描电镜下观察各组脑部血管变化 (高倍放大)



①: 假手术组; ②: TBI 组; ③: 消脱止-M 组

图 2 扫描电镜下观察脑部神经元细胞变化 (高倍放大)

2.4 各组 NSS 比较 (表 2): 制模后 7 d 和 14 d, 消脱止-M 组 NSS 均较 TBI 组明显降低 (均 $P < 0.05$)。

表 2 各组 NSS 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	NSS (分)	
		7 d	14 d
TBI 组	20	9.30 ± 0.53	9.02 ± 0.47
消脱止-M 组	20	8.10 ± 0.35 ^a	6.50 ± 0.57 ^a

注: 与 TBI 组比较, ^a $P < 0.05$

3 讨论

在 TBI 早期, 炎症细胞因子通过炎症级联放大反应调节白细胞聚集和炎症反应, 继而引发神经细胞的损伤和脑水肿, 造成创伤后继发性脑损伤^[9]。

炎症是机体损伤后最基本的病理变化, 是一种

表 1 各组 TNF- α 、NF- κ B mRNA 表达及血清和脑组织 SOD 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数	基因表达		SOD (U/mg)	
			TNF- α	NF- κ B	血清	脑组织
假手术组		12	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	263.56 ± 24.32	223.77 ± 18.42
TBI 组	1 d	20	2.231 ± 0.051 ^a	2.250 ± 0.059 ^a	190.12 ± 6.73 ^a	163.22 ± 14.32 ^a
	3 d	20	2.873 ± 0.055 ^a	2.917 ± 0.063 ^a	151.45 ± 8.55 ^a	156.38 ± 11.32 ^a
	7 d	20	3.953 ± 0.081 ^a	4.017 ± 0.079 ^a	121.16 ± 10.58 ^a	116.27 ± 8.32 ^a
消脱止-M 组	1 d	20	1.483 ± 0.062 ^{ab}	1.692 ± 0.063 ^{ab}	213.37 ± 12.02 ^{ab}	211.56 ± 11.14 ^{ab}
	3 d	20	1.891 ± 0.060 ^{ab}	1.972 ± 0.067 ^{ab}	208.98 ± 15.70 ^{ab}	222.26 ± 8.56 ^{ab}
	7 d	20	2.988 ± 0.077 ^{ab}	3.035 ± 0.064 ^{ab}	181.74 ± 0.59 ^{ab}	199.54 ± 11.01 ^{ab}

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与 TBI 组同期比较, ^b $P < 0.05$

防御性反应。炎症反应过程中形成的肿胀是由巨噬细胞释放的炎症细胞因子促使血管通透性增高和毛细血管扩张, 大量血浆成分渗透到组织间隙所导致^[10]。促炎因子 TNF- α 在这一过程中被激活, 可促使巨噬细胞分泌更多促炎因子, 引发更多继发性炎症反应。而 NF- κ B 可调节多种参与炎症反应且发挥重要作用的基因, TNF- α 就是其中之一^[11]。而具有消肿、抗炎作用的七叶皂苷钠可降低颅脑损伤患者脑脊液炎症因子水平, 改善预后^[12], 同时前炎症因子可溶性神经趋化蛋白 (sFkn) 也参与了 TBI 的病理发展过程^[13]。以上结果均提示, 抑制 NF- κ B 的基因表达可能会对炎症反应及其相关疾病起保护作用。

消脱止-M 的主要活性成分有鞣酸、黄酮、香豆素等, 是以草木犀流浸液为主要成分的纯植物制剂, 其药理学作用包括^[14]: 降低毛细血管通透性和血管阻力; 抑制前列腺素等炎症介质合成; 减轻疼痛和降低血管通透性, 最终减少组织间隙渗出; 减少二磷酸腺苷 (ADP) 和胶原诱导的血小板聚集, 同时还可抑制血小板释放血栓素 A₂ (TXA₂), 阻止血清蛋白的丧失, 维持正常的胶体渗透压、抗水肿; 抑制肾小管氯和钠的重吸收起到利尿作用而消肿; 减轻软组织肿胀, 扩张淋巴管, 增加淋巴液流量, 促进淋巴循环。

有研究发现, 从草木犀提取的成分有抗炎作用, 特别是对促炎因子 TNF- α 及 NF- κ B 具有抑制作用^[15]。还有研究证实, NF- κ B 的活性和表达量受到体内氧化应激水平的调控^[16]。本研究结果显示, 消脱止-M 可显著改善 TBI 导致的脑水肿及神经元损伤, 增加微循环并促进神经功能的修复; 消脱止-M 组大鼠 TNF- α 与 NF- κ B 的基因表达水平较 TBI 组降低, 且 7 d 和 14 d 消脱止-M 组大鼠 NSS 较 TBI 组降低得较为明显, 表明该组神经功能得到恢复; 同时血清与脑组织 SOD 水平在用消脱止-M 干

预后明显上升,表明消脱止-M 可降低体内的氧化应激水平。

综上所述,本研究结果表明,消脱止-M 可降低大鼠 TBI 的氧化应激,进而降低 NF-κB 和 TNF-α 的基因表达,改善脑部水肿和神经元损伤,促进脑部微循环和神经功能修复,为临床 TBI 后改善脑部微循环和神经功能修复提供了新的途径和方法。

参考文献

[1] 杨利孙,章翔,易声禹,等. 重型脑损伤患者脑氧代谢变化及意义. 中国危重病急救医学,2000,12(5):267-269.

[2] 刘长文,郑永科,陆骏,等. Lund 概念与重型颅脑创伤后脑水肿的治疗. 中国危重病急救医学,2010,22(10):610-613.

[3] Fox C, Dingman A, Derugin N, et al. Minocycline confers early but transient protection in the immature brain following focal cerebral ischemia-reperfusion. J Cereb Blood Flow Metab,2005,25(9):1138-1149.

[4] 白玉,张圣焱,王良荣,等. 参麦注射液对外伤性脑损伤大鼠神经元细胞的保护作用. 中国中西医结合急救杂志,2010,17(1):28-30.

[5] Toulmond S, Rothwell NJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits neuronal damage caused by fluid percussion injury in the rat. Brain Res,1995,671(2):261-266.

[6] Pleșca-Manea L, Părvu AE, Părvu M, et al. Effects of Melilotus officinalis on acute inflammation. Phytother Res,2002,16(4):316-319.

[7] 谭翱. 重型颅脑损伤的治疗进展. 中国危重病急救医学,2006,

18(5):317-319.

[8] Mahmood A, Lu D, Wang L, et al. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. Neurosurgery,2001,49(5):1196-1204.

[9] Offner H, Subramanian S, Parker SM, et al. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. J Cereb Blood Flow Metab,2006,26(5):654-665.

[10] 杨俊龙,尚平. 消脱止-M 治疗外伤性肿胀的临床观察. 中国医药指南,2001,9(17):283-284.

[11] Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-κappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. J Biol Chem,1994,269(7):4705-4708.

[12] 杨细平,涂悦,张赛,等. 七叶皂苷钠对重型颅脑创伤患者脑脊液肿瘤坏死因子-α 及白细胞介素-6 表达的影响. 中国中西医结合急救杂志,2011,18(6):329-332.

[13] 张丽娜,关宏,佟建洲,等. 中重度颅脑损伤患者脑脊液中可溶性神经趋化蛋白含量的变化及临床意义. 中国中西医结合急救杂志,2012,19(3):162-165.

[14] 傅传刚,杨巍,孙建华,等. 草木犀流浸液片剂减轻肛门直肠术后水肿疼痛出血的临床研究. 中华胃肠外科杂志,2004,7(1):45-48.

[15] Zhang XY, Tao JY, Zhao L, et al. In vitro anti-inflammatory effects of different solution fractions of ethanol extract from Melilotus suaveolens Ledeb. Chin Med J (Engl),2007,120(22):1992-1998.

[16] Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-κappa B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. Biochem Pharmacol,2006,72(11):1493-1505.

(收稿日期:2013-03-06)
(本文编辑:李银平)

• 消息 •

欢迎订阅 欢迎投稿
国家级杂志《中国中西医结合急救杂志》

中文核心期刊 中国科技论文统计源期刊 影响因子排第一

《中国中西医结合急救杂志》系中国中西医结合学会主办的全国性科技期刊(为中国中西医结合学会系列杂志之一,由《中西医结合实用临床急救》杂志更名),是我国中西医结合急救医学界权威性学术期刊,已进入国内外多家权威性检索系统。本刊为双月刊,64页,国际通用16开大版本,80克双胶纸印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理2013年的订阅手续,邮发代号:6-93,定价:每期10元,全年60元。订阅本刊的读者如果遇有本刊装订错误,请将刊物寄回编辑部调换,我们将负责免费邮寄新刊。2013年以前的合订本和单行本请在杂志社发行部电话订阅:022-23197150。地址:天津市和平区睦南道122号;邮编:300050。

《中国中西医结合急救杂志》已经进入美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)、美国《乌利希期刊指南》(UPD)、中国期刊网、中国知网(CNKI)、万方数据网络系统(China Info)、万方医学网、em120.com危重病急救在线以及国家中医药管理局中国传统医药信息网(<http://www.Medicine China.com>)。投本刊论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议,并由全部作者亲笔在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清,不同意者论文可不投本刊。

《中国中西医结合急救杂志》开设有述评、专题论坛、博士论坛、论著、研究报告、经验交流、病例报告、治则·方剂·针灸、基层园地、临床病理(病例)讨论、消息、读者·作者·编者等栏目,欢迎广大作者踊跃投稿。同时,本刊倡导学术争鸣,对所投稿件将予以重视,优先考虑。

本刊已加入万方数据独家合作体系,本刊2009年以后的杂志在中国知网上无法查询,请登陆万方数据(<http://www.wanfangdata.com.cn>)或万方医学网(<http://med.wanfangdata.com.cn>)查询或下载。本刊有电子中文杂志,网址为<http://www.cccm-em120.com>,可在线阅读本刊各年度的期刊文章,并可下载。

(本刊编辑部)