

三七总皂苷对脑出血大鼠神经功能及脑含水量的影响

赵雪松¹ 樊永平¹ 陈志刚² 高芳²

(1 首都医科大学附属北京天坛医院中医科,北京,100050; 2 北京中医药大学第二附属医院东方医院神经内科,北京,100078)

摘要 目的:研究三七总皂苷对脑出血大鼠神经功能及脑含水量的影响。方法:实验用健康 Sprague-Dawley (SD) 同系雄性大鼠 350 只,体重 230 ~ 250 g,大鼠随机分为假手术组(简称 CG),模型组(简称 MG),用药组(简称 TG)3 个组,每组分 6 h、24 h、48 h、72 h、7 d,5 个时间点。造模用 IV 型胶原酶注入尾壳核,治疗组给予三七总皂苷腹腔注射,1 次/d。在相应时间点,采用改良的神经功能缺损评分(Modified Neurological Severity Score, mNSS)对各时间点神经功能缺损进行评价。结果:各时间点 MG mNSS 和 CG 比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),除 6 h 外,各时间点 MG 和 TG 比, TG mNSS 明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各时间点 MG 脑含水量和 CG 比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),除 6 h、7 d 外,各时间点 MG 和 TG 比, TG 脑含水量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:脑出血模型组中,6 h 开始, mNSS 和脑含水量明显增高,到 48 h 达到高峰,以后逐渐下降,三七总皂苷可以明显下调 mNSS 评分和脑含水量。

关键词 三七总皂苷;脑出血;神经功能;脑含水量

Panax Notoginseng Saponins's Effect on Nerve Function and Cerebral Edema of Rats with Cerebral Hemorrhage

Zhao Xuesong¹, Fan Yongping¹, Chen Zhigang², Gao Fang²

(1 Chinese Medicine Department, Beijing Tiantan Hospital affiliated Capital Medical University, Beijing 100050, China;

2 Neurology Department, Dongfang Hospital Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Panax Notoginseng Saponins (PNS) on the neurological function and cerebral water content in the rats with cerebral hemorrhage. **Methods:** A total of 350 healthy homologous male SD rats, 230 ~ 250 g, were randomly divided into control group, model group and treatment group, and were observed at the following time points: 6 h, 24 h, 48 h, 72 h and 7 days respectively. Rats model was established by IV collagenase type uniform slowly into the tail putamen hemorrhage. The treatment group were given intraperitoneal injection of PNS once a day. The Modified Neurological Severity Score (mNSS) of each group at the same time points was used to evaluate the nerve damage. **Results:** The mNSS of model group was significantly higher at every time point than the control group ($P < 0.05$). Except for 6 h, the mNSS of treatment group was significantly higher at the other time points than the other two groups ($P < 0.05$). The brain water content of the model group was significantly higher at every time point than the control group ($P < 0.05$). Except for the 6 h and 7d time point, the brain water content of the treatment group was significantly lower than the other two groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** In the cerebral hemorrhage model groups, the mNSS and brain water significantly increased at 6 h, reached a peak at 48 h, then gradually declined. PNS can significantly decrease the mNSS scores and brain water content.

Key Words Panax Notoginseng Saponins; Cerebral hemorrhage; Nerve function; Brain water content

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.07.042

脑出血(Intracerebral Hemorrhage, ICH)是最危重的一种卒中类型,占有卒中事件 10% ~ 25%^[1]。ICH 的病死率明显高于缺血性卒中,直接病死率为 38% ~ 43%,病残率为 70% ~ 80%,其复发率约为 1.8% ~ 11%^[2-3]。ICH 具有发病急、变化快、病情危重、病机复杂等特点,临床必须紧急救治,故急性期救治对提高抢救成功率和患者的生活质量具有重要意义。目前关于 ICH 急性期的治疗无突破性的进展,尤其是内科治疗,多限于脱水降颅压、调

整血压、改善营养代谢和防治并发症等对症及支持疗法,缺乏针对性强、有效的治疗手段,多数 ICH 患者都留下神经功能缺损。ICH 后脑损伤的机制很多,包括血肿的扩大、血肿周围组织缺血(缺血性半暗带)、血肿周围组织脑水肿等,在血肿形成过程中和形成后,都存在脑水肿,脑水肿具有神经毒性,破坏神经的正常功能^[4]。本研究通过三七总皂苷对脑出血大鼠神经功能评分及脑含水量的影响,探讨其对脑出血的治疗作用。

基金项目:北京市中医药科技项目(编号:QN2014-17);首都医科大学附属北京天坛医院青年科研基金(编号:2014-YQN-YS-06)

作者简介:赵雪松(1981.03—),男,医学博士,住院医师,研究方向:中医内科脑病, E-mail:65835337@qq.com

通信作者:樊永平(1965.01—),男,医学博士,主任医师,科主任,研究方向:中医治疗脑病临床和研究, Tel:(010)67096662, E-mail:yongping@hotmail.com

1 材料与方 法

1.1 试剂与动物模型的制备

1.1.1 实验动物与分组 实验用健康 Sprague-Dawley (SD) 同系雄性大鼠 350 只, 体重 230 ~ 250 g, 动物许可证号是 SCXK (京) 2012-0001, 实验动物全部从北京维通利华实验动物技术有限公司购买。动物每笼 10 只群养, 饲养于普通级动物房, 室内温度保持为 (22 ± 2) °C, 相对湿度保持为 30% ~ 40%。各组大鼠常规饲料, 自由进食饮水。

1.1.2 主要实验设备及试剂 立体定位仪 (Model310), 日本 stoelting 公司, IV 型胶原酶, sigma 公司, 货号 C-5138, 三七总皂苷, 广西梧州制药集团股份有限公司, 电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9145A 型), 上海一恒科技有限公司, 离心机 (Eppendorf Centrifuge 5810R), 德国 EPPENDORF 公司, 微量进样器, 上海安亭器械厂, 水合氯醛 (批号 20111024), 国家集团化学试剂有限公司, 精密电子天平 (1/1000, A2005), Saitorius 公司, 超低温冰箱 (MDF-U32V), SANYO 公司。

1.1.3 动物模型制作及给药 脑出血大鼠动物模型参考了 Rosenberg 等提出的方法进行制备。术前准备: 首先大鼠在造模前 8 h 采取禁食和禁水措施, 其次把配置好的麻药 (10% 水合氯醛)、手术器械、立体定位仪、冰块、药品等准备好, 最后用医用生理盐水洗涤微量进样器数遍, 直到管壁光滑, 针头没有存留杂物。造模过程: 1) 称重, 然后按每 100 g 体重 0.4 mL 的比例腹腔注射麻醉, 麻药给药后, 大约 5 ~ 10 min 麻醉完成。2) 给实验大鼠头部备皮, 沿头正中中部切开皮肤, 向左右分开皮肤, 用棉球擦掉骨膜, 如出血, 按压止血, 充分暴露前囟, 接着用微量进样器抽取配置好的胶原酶溶液 (每 1 μL 溶液含 IV 型胶原酶 0.2 U), 把微量进样器和大鼠分别固定于立体定位仪上。3) 参照大鼠脑立体定位图谱, 右侧尾壳核体表位于前囟右 3 mm 后 1 mm 处, 微量进样器针头对准前囟, 调节旋钮, 向后移动 3 mm, 向后移动 1 mm, 记号笔标记此点, 然后用颅骨钻钻开颅骨, 再向下移动 5.5 mm, 启动微量进样器, 把 2 μL 胶原酶匀速缓慢打入尾壳核 (模型组和用药组老鼠), 假手术组则用微量进样器打入 2 μL 灭菌生理盐水, 留针 5 min, 缓慢退出微量进样器, 切口撒适量青霉素钾粉, 缝合伤口回笼饲养。

本实验采用的药物是三七总皂苷的成品药物血栓通针粉, 各组实验大鼠分为 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 d, 5 个时间点, 给药根据时间点的不同而不同。生

理盐水和血栓通针粉都通过腹腔注射给药, 生理盐水给药量为每 100 g 体重 1 mL, 血栓通给药量为每 100 g 体重 0.72 mL, 配置时溶液中含有 10 mg/mL 血栓通。6 h 时间点的假手术组和模型组大鼠于造模完成后立即按体重腹腔注射生理盐水, 用药组按体重立即腹腔注射血栓通, 6 h 后取材。24 h 时间点的假手术组和模型组大鼠于造模完成后立即按体重腹腔注射生理盐水, 用药组按体重立即腹腔注射血栓通, 24 h 后取材。48 h 时间点的假手术组和模型组大鼠于造模完成后立即按体重腹腔注射生理盐水, 用药组按体重立即腹腔注射血栓通, 24 h 后各组再注射 1 次, 造模后 48 h 取材。72 h 时间点的假手术组和模型组大鼠于造模完成后立即按体重腹腔注射生理盐水, 用药组按体重立即腹腔注射血栓通, 24 h 后各组再注射 1 次, 48 h 后各组再注射 1 次, 造模后 72 h 取材。7 d 时间点的假手术组和模型组大鼠于造模完成后立即按体重腹腔注射生理盐水, 用药组按体重立即腹腔注射血栓通, 24 h 后各组再注射 1 次, 48 h 后各组再注射 1 次, 72 h 后各组再注射 1 次, 4 d 后各组再注射 1 次, 5 d 后各组再注射 1 次, 6 d 后各组再注射 1 次, 造模后 7 d 取材。

表 1 改良的神经功能缺损评分表

测评项目	分值
提尾反射 (正常 0 分, 最大 3 分)	(3)
前肢屈曲	1
后肢屈曲	1
头上抬距垂直轴 > 100, 且维持在 30 s 之内	1
行走测试 (正常 0 分, 最大 3 分)	(3)
正常行走	0
不能走直线	1
向偏瘫侧转圈	2
向偏瘫侧倾倒	3
感觉测试 (正常 0 分, 最大 2 分)	(2)
视觉和触觉测试	1
深感觉测试 (拉爪子加强肌肉收缩)	1
平衡测试 (正常 0 分, 最大 6 分)	(6)
平衡良好	0
抓住平衡木的边缘	1
悬荡并且一只爪子掉下来	2
悬荡并且两只爪子掉下来或者在平衡木上旋转 (> 60 s)	3
试图在平衡木上保持平衡但失败 (> 40 s)	4
试图在平衡木上保持平衡但失败 (> 20 s)	5
掉下来, 没有试图在平衡木上保持平衡	6
反射缺失和反常运动 (正常 0 分, 最大 4 分)	(4)
耳廓反射 (当耳廓被触动时, 头晃动)	1
角膜反射 (当用棉花轻触角膜时, 眼睛眨动)	1
惊吓反射 (噪声引起的运动反应)	1
抓握、肌阵挛、肌张力障碍	1
最大得分	(18)

1.2 实验方法

1.2.1 mNSS 评分神经功能 改良的神经功能缺损评分 (Modified Neurological Severity Score, mNSS) 评定神经功能。将每组各时间点大鼠在相应时间点做 mNSS 评分, mNSS 是目前国际上公认的大鼠脑卒中后神经功能缺失评判标准, 主要包括提尾反射、行走测试、感觉测试、平衡测试、反射缺失和反常运动。最大得分为 18 分, 缺少一项反射或动物不能完成一项任务给 1 分, 轻型伤: 1~6 分; 中型伤: 7~12 分; 重型伤: 13~18 分。评定指标及方法见表 1。

1.2.2 脑含水量测定 于相应时间点麻醉大鼠后, 断头取脑, 立即称重并记录每只大鼠鼠脑的湿重, 用锡箔纸包裹, 并标号, 然后放入 -70 °C 冰箱冻存, 集中放入 110 °C 恒温箱中烘干至恒重, 24 h 后取出立即称取干重。

1.3 统计学方法 实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件包进行数据统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 或非参数检验进行统

计处理, 统计结果数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mNSS 评分测定 假手术组注射生理盐水对大鼠脑组织有损伤, 动物干预后会存在短时的神经功能障碍, 24 h 时神经功能恢复正常; 脑出血组神经功能评分较高, 在 48 h 时神经功能缺失最重, 同假手术组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 治疗组运动、感觉、平衡以及反射 4 个方面缺失程度减轻, mNSS 神经功能评分明显低于脑出血组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

2.2 脑含水量测定 脑含水量按 Billiot 公式计算, 脑含水量 = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。与假手术组比较, 模型组各时间点脑含水量变化明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 模型组脑含水量 6 h 开始升高, 48 h 达到高峰, 以后逐渐下降。除 6 h、7 d 外, 其余各时间点模型组和用药组比较, 用药组脑含水量明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3、图 2。

表 2 三七总皂苷干预脑出血大鼠后 mNSS 评分的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	6 h	24 h	48 h	72 h	7 d
CG	10	1.50 ± 0.71	0.6 ± 0.52	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
MG	10	6.30 ± 0.95*	10.0 ± 1.25*	12.5 ± 1.51*	12.0 ± 0.67*	8.30 ± 0.67*
TG	10	5.90 ± 0.74	8.10 ± 0.74 [△]	10.9 ± 0.88 [△]	9.5 ± 0.71 [△]	5.70 ± 0.82 [△]

注: 假手术组简称 CG; 模型组简称 MG; 用药组简称 TG; 相应时间点与假手术组比较, * $P < 0.05$, 与模型组比较, [△] $P < 0.05$ 。

表 3 三七总皂苷干预脑出血大鼠后脑含水量的变化 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	只数	6 h	24 h	48 h	72 h	7 d
CG	10	70.52 ± 1.15	70.35 ± 0.65	70.01 ± 2.38	70.34 ± 0.89	69.19 ± 1.20
MG	10	73.14 ± 0.97*	77.16 ± 0.65*	80.97 ± 2.73*	78.85 ± 1.10*	72.42 ± 0.83*
TG	10	71.64 ± 1.92	75.06 ± 1.05 [△]	75.25 ± 0.83 [△]	73.47 ± 1.39 [△]	71.77 ± 0.58 [△]

注: 假手术组简称 CG; 模型组简称 MG; 用药组简称 TG; 相应时间点与假手术组比较, * $P < 0.05$, 与模型组比较, [△] $P < 0.05$ 。

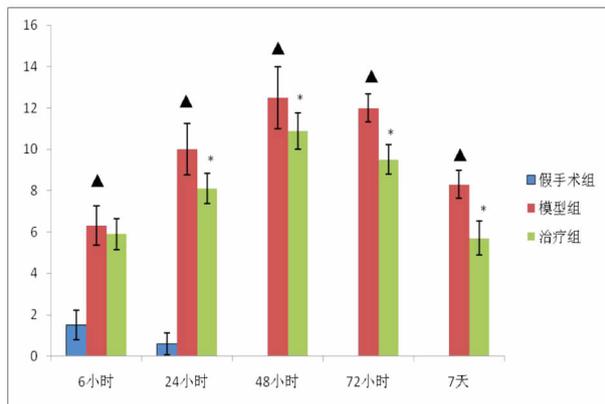


图 1 三七总皂苷干预脑出血大鼠后 mNSS 评分的变化

注: 相应时间点与假手术组比较, [△] $P < 0.05$, 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

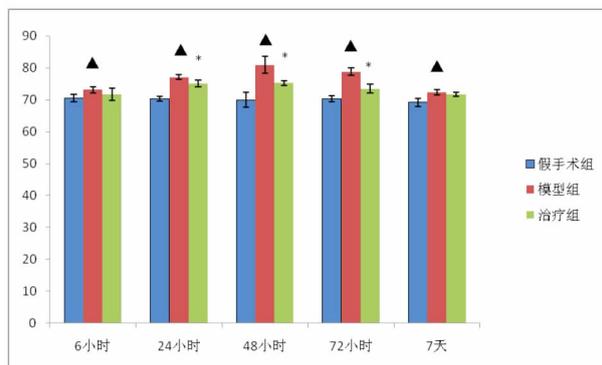


图 2 三七总皂苷干预脑出血大鼠后脑含水量的变化

注: 相应时间点与假手术组比较, [△] $P < 0.05$, 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

ICH 后的神经损害主要分为两方面,其一是血肿扩大及占位效应引发的原发性损伤,其二是脑水肿,炎性反应所致的继发性神经损伤,原发性损伤往往不可逆,继发性损伤是可以减轻的。脑出血后脑水肿和炎性反应是继发性脑损伤的主要原因,研究发现凝血酶在继发性脑损伤中扮演着重要角色,它与 par-1、NMDANR、MMP-9 和 NF- κ B 相互作用,诱发脑水肿和炎性反应,加重脑损伤。脑出血后血肿压迫微循环引起的周围组织缺血、缺氧^[5],凝血酶激活,进一步破坏血脑屏障完整性,白细胞在脑组织中聚集并诱导某些活性物质如 MMP-9、TNF- α 释放^[6],兴奋性氨基酸与细胞的特异性受体相结合,引起细胞能量需求增加等都可以诱发加重脑水肿^[7]。脑出血属于中医学的中风病,其基本病理演变为瘀血阻滞,脉络不畅,日久化毒;毒留脉内,日久化火,灼伤脉络,或毒邪伤络,血溢成瘀,或毒邪伤津,血滞为瘀,瘀毒互彰,毒损脑髓,髓损神伤,终致神明受扰,神机失用,昏蒙昏馈,病机根本在于瘀血,治以活血化瘀,药物选用中药三七的提取物血栓通冻干粉,三七味寒、微苦,性温,入肝、胃、大肠经,具有止血散瘀,消肿定痛的功效,止血而不留瘀。三七的活性成分为三七总皂苷,主要用于中枢神经系统、心血管系统、血液系统疾病,并有抗炎、改善肾功能等作用,可促进脑出血颅内血肿的吸收、减轻脑水肿和炎性反应、清除自由基、改善血肿周围微循环、降低血脑屏障通透性以治疗出血性中风,促进脑出血后神经元的存活及损伤修复。

造模后,对实验动物各时间点神经功能缺损进行评价,假手术组注射生理盐水对大鼠脑组织有损伤,实验干预后会存在短时的神经功能障碍,24 h 时神经功能恢复正常;脑出血组神经功能评分较高,6 h 开始到 48 h 逐渐升高,在 48 h 时达到峰值,神经功能缺损最重,以后缓慢下降,模型组与假手术组比较,5 个时间点均有差异统计学意义(均 $P < 0.05$),佐证了模型制作成功,说明脑出血发生后,神经功能很快出现缺损,6 h 即可见,变化呈先升后降趋势,在 48 h 时达峰值。用药组经治疗后,运动、感觉、平衡以及反射 4 个方面神经功能缺失程度减轻,用药组与模型组比较,神经缺损评分比相应时间点模型组都下降,除 6 h 组下降较小,差异无统计学意义外($P = 0.228$),其余各组神经功能缺损评分较相应时间点模型组差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),6 h 组无统计学意义($P > 0.05$)可能是由于药物没有充

分发挥作用所致,但是依据均值来看,用药组比模型组下降,说明治疗还是有效果的。其余各组 mNSS 评分明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明三七总皂苷对于减轻大鼠脑出血后神经功能缺损是有效的,为临床活血化瘀药治疗脑出血提供实验依据。

采用 Billiot 公式计算脑含水量,脑含水量 = (湿重 - 干重) / 湿重 $\times 100\%$,假手术组注射生理盐水对大鼠脑组织造成损伤,出现轻度的脑水肿,随着时间的推移,基本呈减轻趋势,在 1 周的时候减到最小。模型组大鼠脑含水量呈先升高后下降趋势,在造模后 6 h 即出现脑水肿,以后急速升高,在 48 h 达到顶峰,从 72 h 开始逐渐下降,7 d 时基本接近正常。假手术组和模型组比较,各时间点差异有统计学意义($P < 0.05$),说明脑出血后脑水肿是一个非常普遍而且重要的变化,它对神经功能产生了重大影响,也是我们关注的重点。用药治疗后,各时间点脑水肿都减轻,用药组与模型组比较,6 h 时间点虽然有下降,但是差异无统计学意义($P = 0.062$),原因可能是由于药物还没有充分发挥作用,但是据实验数据来看,用药组比模型组下降,说明治疗还是有效果的。24 h、48 h、72 h,3 个时间点的模型组和用药组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。7 d 组用药组与模型组比较,虽然脑水肿有所减轻,但是差异无统计学意义($P = 0.41$),究其原因可能是第 7 天时,脑水肿原本就自发的缓解了,从实验数据来看,用药后对脑水肿起了下调作用,说明治疗是有效的。总的来说,三七总皂苷对脑出血后脑水肿有治疗作用,为临床活血化瘀药治疗脑出血提供实验依据。

参考文献

- [1] Lee JC, Cho GS, Choi BO, et al. Intracerebral hemorrhage-induced brain injury is aggravated in senescence accelerated pronemine[J]. Stroke, 2006, 37(1): 216-222.
- [2] 邓宝康. 临床各科疑难病诊治与康复[M]. 西安:世界图书出版西安公司, 2000:9.
- [3] Passero S, Buralgassi L, D'Andrea P, et al. Recurrence of bleeding in patients with Primarily intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 1995, 26(7): 1189-1192.
- [4] Gong Y, Hua Y, Keep RF, et al. Intracerebral hemorrhage: effects of aging on brain edema and neurological deficits[J]. Stroke, 2004, 35(11): 2571-2575.
- [5] 吕田明, 陆兵勋. 大鼠尾状核注射凝固自体动脉血脑出血模型[J]. J Apoplexy and Nervous Diseases, 2006, 23(1): 88-90.
- [6] Lee KR, Colon GP, Betz AL, et al. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin[J]. J Neurosurg, 1996, 84(1): 91-96.
- [7] 尹匕, 杨于嘉, 虞佩兰等. 大鼠脑水肿组织谷氨酸与 γ -氨基丁酸的改变及黄芩试对其影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(7): 524-526.