

# 早期使用三七总皂苷对大鼠脑出血炎症反应的影响

赵雪松 陈志刚 徐枝芳 高芳

(北京中医药大学东方医院神经内科,北京,100078)

**摘要** 目的:早期使用三七总皂苷对脑出血大鼠(Intracerebral Hemorrhage, ICH)脑组织病理形态和炎症反应递质细胞间黏附分子-1(Intercellular Adhesion Molecule-1, ICAM-1)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的影响。方法:将SD大鼠随机分为假手术组、模型组和三七总皂苷组,采用胶原酶注射尾状核法制作脑出血模型,观察脑组织病理形态变化;双抗体夹心-酶联免疫吸附实验(Avidinbiotincomplex-ELISA, ABC-ELISA)观察 ICH 大鼠血清炎症反应递质 ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  的变化。结果:HE 染色观察到炎性细胞浸润,也证实了脑出血急性期炎症反应反应较剧烈,三七总皂苷显著减轻周围脑组织水肿和神经纤维排列紊乱现象;造模 7 d 时,模型组血清中的 ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  含量增加,三七总皂苷用药 7 d 可下调 ICAM-1 ( $P < 0.05$ ) 和 TNF- $\alpha$ 。结论:三七总皂苷对脑出血后脑组织病理形态恢复正常具有促进作用,抑制 ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  的释放,可能是神经元保护的作用机制之一。

**关键词** 脑出血;脑组织病理;细胞间黏附分子-1;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;三七总皂苷

## The Effect of Early Use of Panax Notoginseng Saponins on Inflammation in Rats with Cerebral Hemorrhage

Zhao Xuesong, Chen Zhigang, Xu Zhifang, Gao Fang

(Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

**Abstract Objective:** To study the effect of early use of Panax notoginseng saponins (PNS) on the pathomorphological brain tissues, ICAM-1 and TNF- $\alpha$  in rats with cerebral hemorrhage (ICH). **Methods:** SD rats were randomly divided into sham group, model group and PNS group, and ICH models were made with collagenase VII injected into the rats' caudate nucleus. The morphological changes in the brain were observed. ICAM-1 and TNF- $\alpha$  in the serum were measured by the method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** The region around the hematoma infiltrated by inflammatory cells was observed by HS staining, and PNS significantly reduced the brain edema and ameliorated disorderly arrangement of nerve fibers; On the 7th day after ICH, the level of ICAM-1 and TNF- $\alpha$  in the serum was still higher in the model group compared with that in the sham group, and the administration of Panax notoginseng saponins down-regulated ICAM-1 ( $P < 0.05$ ) and TNF- $\alpha$ . **Conclusion:** Panax notoginseng saponins can alleviate the pathomorphological brain tissues of cerebral hemorrhage, and it could inhibit the release of ICAM-1 and TNF- $\alpha$  so as to protect the neurons.

**Key Words** Cerebral hemorrhage; Brain pathomorphology; ICAM-1; TNF- $\alpha$ ; Panax notoginseng saponins

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.07.027

脑出血 (Intracerebral Hemorrhage, ICH) 是一种最危重的卒中类型,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,目前缺乏有效的、针对性强的治疗手段。近年研究表明脑出血血肿周围组织有炎症反应存在,较非出血性脑损伤明显,且在脑出血的继发性损伤中具有重要意义。本研究用三七总皂苷 (PNS) 干预实验脑出血大鼠,观察其对脑组织病理形态的改变和炎症反应递质的影响,为使用三七总皂苷早期治疗脑出血提供理论依据和支持。

### 1 实验材料

1.1 动物及分组 SD 雄性大鼠,体重 250~310 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司 SPF/VAF 级,合格证号:SCXK(京)2007-0001,实验动物随机分为假手术组、模型组和三七总皂苷组。

1.2 药物及试剂 VII 型胶原酶:Sigma 公司 美国;三

七总皂苷注射液:注射用血栓通冻干粉,购自广西梧州制药股份有限公司(批号:070911),规格:150 mg/支,使用时用 0.9% 生理盐水新鲜配置为 10 mg/mL;0.9% 生理盐水:北京双鹤药业股份有限公司(批号:0706271W),规格:500 mL:4.5 g;水合氯醛:北京化学试剂公司(批号:050308),用生理盐水制成 10% 浓度;多聚甲醛:北京益利精细化学品有限公司(批号:20060712),使用时配置为 4% 多聚甲醛-磷酸二氢钠/氢氧化钠溶液, pH7.2~7.4;大鼠 ICAM-1 定量 EIA 试剂盒:北京环亚泰克生物医学技术有限公司;大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  定量酶联检测试剂盒:北京环亚泰克生物医学技术有限公司。

1.3 仪器 SN-2 型脑立体定位仪:Narishige Scientific Lab 日本;微量进样器(0~5  $\mu$ L):宁波市镇海玻璃仪器厂 中国;电子天平 PW-3 型:上海凯士电子有

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(新教师类)(编号:2011001312001);北京中医药大学科研创新团队项目中医脑病形神一体化防治研究团队(编号:2011-CXTD-23)

作者简介:赵雪松(1981—)男,在读博士研究生,研究方向:中医内科学脑病, E-mail:13811347860@139.com

通信作者:陈志刚(1964—)男,主任医师,博士生导师,硕士,研究方向:中医内科学脑病, E-mail:zgchen01@yahoo.com.cn

限公司 中国;电子天平(32212):上海精密科学仪器有限公司 中国;石蜡切片机:Leica RM2135 德国;显微镜:Olympus BX60 日本;SPO-Ⅱ数码成相软件:美国;数码相机:SONY T7 光学变焦 3.0 日本;酶标仪:DENLEY DRAGON Wellscan MK;Thermo 芬兰;分析软件:Ascent software for Multiskan;洗板机:Wellwash 4 MK2;Thermo 芬兰;数字显示隔水式电热恒温培养箱 PYX-DHS:上海跃进医疗器械厂 中国;离心机 TGL-168(编号 11-07):上海安亭科学仪器厂 中国;P200 微量可调移液器(规格 20~200  $\mu\text{L}$ ):Thermo labsystems 芬兰。

## 2 实验方法

2.1 造模 动物用 10% 水合氯醛(0.4 mg/kg)腹腔麻醉,俯卧位固定在脑立体定位仪上,将头背部皮肤消毒后,切开头部正中皮肤,暴露颅骨,参照包新明《大鼠脑立体定位图谱》<sup>[1]</sup>,以大鼠前囟为“0”点,横坐标向右开 3 mm,向前开 1 mm,钻开颅骨,直径 1 mm,将微量注射器取 1  $\mu\text{L}$  胶原酶(含有胶原酶 1U)固定于脑立体定位仪上,垂直向下进针 5.5 mm,即尾状核部位。3 min 内注完胶原酶,留针 7 min,缓慢退出,用少量庆大霉素防止感染,缝合切口,分笼饲养。假手术组动物以微量进液器内不加入任何液体,余操作同胶原酶造模组。采用标准鼠饲料常规喂养,自由饮水。

2.2 给药 造模后立即 ip 给药 1 次,1 次/d,连续 7 d,直至取材前 1 d。给药组予三七总皂苷注射液 72 mg/kg(10 mg/mL),模型组和假手术组给予 0.9% 生理盐水 7.2 mL/kg。

2.3 取材方法 各组动物分别于造模后 48 h、7 d 经 10% 水合氯醛麻醉,从深麻醉后仰卧固定,迅速剪开胸壁,暴露心脏,经心脏用 150 mL 生理盐水灌注至血液冲尽,换用 4% 多聚甲醛-磷酸二氢钠/氢氧化钠灌注固定,灌注速度先快后慢,到大鼠四肢及尾巴伸直变硬灌注完成。断头取脑,沿注射胶原酶进针孔冠状切开,将脑组织置入 4% 多聚甲醛-磷酸二氢钠/氢氧化钠中固定 24 h,沿血肿冠状面切下厚 2 mm 的脑片,经常规脱水、透明、浸蜡和石蜡包埋,连续作厚度为 5  $\mu\text{m}$  的石蜡切片制备用于 HE 染色。7 d 腹主动脉取血,做双抗体夹心-酶联免疫吸附实验。

2.4 HE 染色 HE 染色步骤如下:石蜡切片常规脱蜡至脱水。流水冲洗 10 min。苏木素染色 20 min。充分水洗。0.5% 伊红染液 5 min。流水冲洗 10 min。滴度乙醇脱水、二甲苯透明。中性树胶封片。光镜下观察血肿面积大小、血肿及其周围组织的病理学变化等。图片见附图。

2.5 双抗体夹心-酶联免疫吸附实验 主要步骤如

下:实验前 20 min 从冰箱中取出试剂盒,以平衡至室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$ )。取出所需数量的板条,其余密封放回 4 $^{\circ}\text{C}$ 。建立标准曲线:设标准孔 8 孔,每孔中各加入样品稀释液 100  $\mu\text{L}$ ,第一孔加标准品 100  $\mu\text{L}$ ,混匀后用加样器吸出 100  $\mu\text{L}$ ,移至第二孔。如此反复作对倍稀释至第七孔,最后,从第七孔中吸出 100  $\mu\text{L}$  弃去,使之体积均为 100  $\mu\text{L}$ 。第八孔为空白对照。加样:待测品孔中每孔各加入待测样品 100  $\mu\text{L}$ 。将反应板置 37 $^{\circ}\text{C}$ , 120 min。洗板:用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次,向滤纸上印干。每孔中加入第一抗体工作液(ICAM-1 100  $\mu\text{L}$ /TNF- $\alpha$  50  $\mu\text{L}$ )。将反应板置 37 $^{\circ}\text{C}$ , 60 min。洗板:同前。每孔中加酶标抗体工作液 100  $\mu\text{L}$ 。将反应板置 37 $^{\circ}\text{C}$ , 60 min。洗板:同前。每孔加入底物工作液 100  $\mu\text{L}$ ,置 37 $^{\circ}\text{C}$  暗处反应 5~10 min。每孔加入 1 滴终止液混匀。在 492 nm 处测吸光值(应尽快,时间过长可能导致本底偏高)。结果计算与判断:所有 OD 值都应减除空白值后再行计算。ICAM-1:以标准品 2000、1000、500、250、125、62.5、31、0 ng/mL 之 OD 值在半对数纸上作图,画出标准曲线。TNF- $\alpha$ :以标准品 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.62、0 pg/mL 之 OD 值在半对数纸上作图,画出标准曲线。将浓度作为 X 轴,OD 值作为 Y 轴,曲线应为一光滑曲线。根据样品 OD 值在该曲线上查出相应大鼠 ICAM-1/TNF- $\alpha$  含量。

2.6 统计方法 采用 SPSS 13.0 进行数据统计分析,数值采用  $\bar{x} \pm s$  表达,3 组间比较采用 ANOVA 分析,两两比较用  $t$  检验。

## 3 结果

3.1 HE 染色发现,假手术组双侧脑组织结构致密,细胞排列整齐,胞浆淡染,核仁清楚(附图 1、4)。

模型组各标本右侧尾状核均有大片出血灶,病灶边缘血管扩张,出血灶周围脑组织显著水肿,组织疏松,出血灶周围有少量胶质细胞,神经细胞肿大、疏松、空泡样变性或皱缩;神经纤维排列紊乱、皱缩及断裂,出现空泡;大量炎性细胞浸润,血管腔内红细胞聚集堵塞微血管;7 d 时出血灶可见含铁血黄素颗粒,形成胶质瘢痕结节,并出现空洞(附图 2、5)。三七总皂苷组出血灶部分吸收、机化,周围脑组织水肿显著减轻,神经纤维排列紊乱现象显著减轻(附图 3、6)。模型组和三七总皂苷组健侧脑组织为正常组织形态。

3.2 造模 7 d 时,模型组血清中的 ICAM-1 含量增加(与假手术组比较  $P=0.025$ ),三七总皂苷组低于模型组( $P=0.031$ ),三七总皂苷组含量与假手术组差异无统计学意义( $P=0.862$ )。造模 7 d, TNF- $\alpha$  含量呈现

模型组 > 三七总皂苷组 > 假手术组, 但组间比较差异 均无统计学意义, 如表 1 所示:

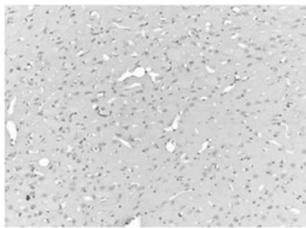


图1 造模 48 h 假手术组 20×

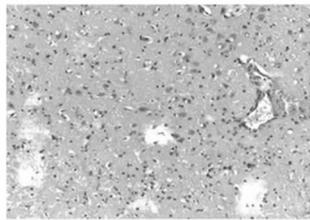


图2 造模 48 h 模型组 20×

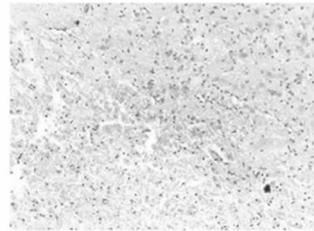


图3 造模 48 h 三七总皂苷组 20×

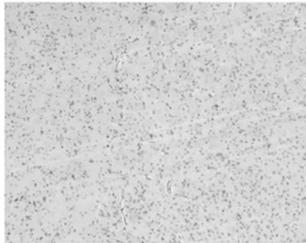


图4 造模 7 d 假手术组 10×

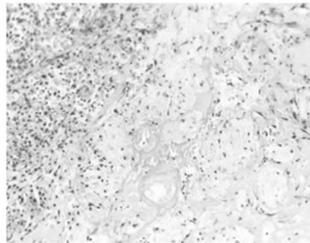


图5 造模 7 d 模型组 20×

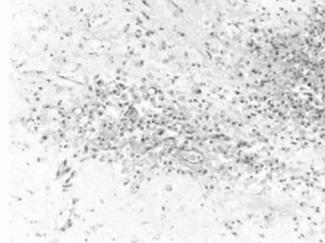


图6 造模 7 d 三七总皂苷组 20×

表 1 造模 7 d 血清 ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  含量的组间比较 (pg/mL) ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	ICAM-1 含量(n=8)	TNF- $\alpha$ 含量(n=8)
假手术组	310.50 $\pm$ 16.6	0.224 $\pm$ 0.029
模型组	350.50 $\pm$ 39.30*	0.239 $\pm$ 0.023
三七总皂苷组	312.00 $\pm$ 17.39 $\Delta$	0.228 $\pm$ 0.024

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

胶原酶注射法诱导 ICH, 胶原酶对脑血管基底膜具有破坏作用, 脑内血管破裂, 血液进入脑组织内。造模 48 h 后取材经 HE 染色, 在光学显微镜下观察, 红细胞弥漫于基底核区并可见水肿的形成。水肿区神经元结构模糊, 变性坏死, 细胞皱缩浓染, 水肿周围区内可见组织疏松, 细胞不同程度水肿。作为机体的一种防御反应, 出现白细胞浸润和小胶质细胞激活。活化的白细胞可发生流变学改变, 表现为变形性降低和黏附性、聚集性增高, 嵌塞微血管, 导致微循环有效面积减少。健侧无明显上述改变。随着出血后病程的发展, 机体进行损伤后的修复。在出血后 7 d, 在基底核出血区可见胶质瘢痕形成, 由于小胶质细胞吞噬了大量的红细胞, 形成了含铁血黄素颗粒。三七总皂苷组水肿体积小于模型组, 提示三七总皂苷有一定促进水肿吸收的作用。本实验造模后脑组织可见水肿、组织水肿和纤维化, 因此组织病理学上符合血瘀征象。此外, HE 染色观察到炎性细胞浸润也证实了脑出血急性期炎性反应较剧烈。

ICH 后存在明显的炎性反应, ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  不同程度升高, 可能加重继发性脑损伤。早期使用

三七总皂苷可促进 ICH 后神经功能缺损的恢复, 抑制炎性反应递质 ICAM-1 的表达, 一定程度下调 TNF- $\alpha$ , 减轻神经元损伤可能是三七总皂苷的治疗机制之一。何氏<sup>[2]</sup>报道三七总皂苷可抑制大鼠局灶性脑缺血再灌注后 ICAM-1 表达和中性粒细胞浸润, 减轻脑梗死区炎性反应, 主要机制为抑制炎性反应递质释放和降低血脑屏障通透性, 减轻脑水肿, 提示三七总皂苷有一定的抗炎作用。ICH 后水肿周围炎性反应的前提条件是炎性细胞黏附于血管内皮细胞, 黏附分子是介导黏附的重要因素, 其中 ICAM-1 起着核心作用, 也介导炎性细胞参与血脑屏障内皮细胞损害的病理过程。ICH 早期 ICAM-1 广泛分布于上皮细胞、血管内皮细胞、网状细胞、单核细胞和淋巴细胞, 其中以血管内皮细胞表达最强, 引起中性粒细胞浸润, 释放大量的活性氧, 参与继发脑损伤<sup>[3]</sup>。同时, 表达 ICAM-1 的白细胞活化后产生大量的蛋白水解酶, 特别是基质金属蛋白酶(MMPs), 氧自由基、花生四烯酸代谢产物等, 增加血脑屏障通透性, 形成血管源性脑水肿<sup>[4]</sup>。正常情况下, ICAM-1 可以在内皮细胞有低水平的表达, 但在炎性细胞因子, 如 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IFN- $\gamma$  等刺激下表达可明显增高。ICAM-1 还可以从血管内皮细胞表面脱落, 成为可溶性细胞间黏附分子-1(soluble-ICAM-1, sICAM-1), 但仍保持与 LFA-1 结合的功能, 缺血性卒中患者血清中可溶性 ICAM-1 的水平与脑组织、血脑屏障的损坏程度有关<sup>[5]</sup>。实验研究证明, 大鼠 ICH 后 24 h 血管内皮出现 ICAM-1, 7 d 达高峰, 持续 2 周<sup>[6]</sup>。

ICH 后神经元、星形细胞和小胶质细胞均可产生 TNF- $\alpha$ ，它是炎症反应的触发因子，一方面脑组织损伤后星形细胞、血管内皮细胞以及小胶质细胞首先表达 TNF- $\alpha$ ，另一方面由 TNF- $\alpha$  可直接促进中性粒细胞向病灶区聚集，诱导白细胞、受损组织细胞释放更多的细胞因子，这是前炎症反应细胞因子形成的一个正反馈机制。TNF- $\alpha$  还具有神经毒性作用，表达增加可加速细胞死亡。而 TNF- $\alpha$  神经毒性和促细胞死亡的作用可能会使血脑屏障破坏，通透性增加，引起脑水肿<sup>[7]</sup>。7 d 时血清 TNF- $\alpha$  虽成模型组 > 三七总皂苷组 > 假手术 7 的趋势，但并无统计学意义，查阅相关文献发现，TNF- $\alpha$  在 ICH 后 24 ~ 72 h 之间达到高峰，之后下降，故考虑此阴性结果与造模 7 d 时 TNF- $\alpha$  已自行下降有关。

参考文献

[1] 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: 24-48.

[2] 何蔚, 朱遵平. 三七总皂苷对大鼠脑梗死区 ICAM-1 表达和中性粒细胞浸润的影响[J]. 中药材, 2005, 28(5): 403-405.  
 [3] 智迄惠, 黎杏群, 罗云, 等. NF- $\kappa$ B 及 ICAM-1 在脑出血大鼠及过氧化氢损伤大鼠脑微血管内皮细胞中的表达[J]. 中国病理生理杂志. 2007, 23(4): 693-698.  
 [4] 梁志刚, 刘兆孔, 高晓兰, 等. 脑出血大鼠血肿周围脑组织细胞间黏附分子的表达与脑水肿的关系[J]. 临床神经杂志, 2006, 19(1): 67-69.  
 [5] Pleines UE, Stover JF, Kossman T, et al. Soluble ICAM-1 in CSF coincides with the extent of cerebral damage in patients with severe traumatic brain injury[J]. Neurotrauma, 1998, 15(6): 399-409.  
 [6] Chao g, Julian T H, RICHARD F K. Acute inflammatory reaction following experimental intracerebral hemorrhage in rats[J]. Brain Res, 2000, 871(1): 57-65.  
 [7] Castillo J, Davalos A, Alvarez-sabin J, et al. Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage[J]. Neurology, 2002, 58(4): 624-629.

(2013-04-09 收稿)

# 银马抗病毒颗粒抗菌、抑制迟发性超敏免疫反应的实验研究

张俊明 郭 晟 方 铝 余 华 钟小群 张爱华

(江西省药物研究所, 南昌, 330029)

**摘要** 目的: 研究银马抗病毒颗粒抗菌及对迟发性免疫反应的作用。方法: 通过体外试管倍比稀释法及体内抗菌, 观察银马抗病毒颗粒的抗菌作用; 通过二硝基氟苯对小鼠致敏试验, 观察银马抗病毒颗粒对小鼠的迟发性免疫反应的作用。结果: 银马抗病毒颗粒药物浓度为 0.125 g · mL<sup>-1</sup> 时, 在体外对金黄色葡萄菌、乙型溶血性链球菌、甲型链球菌、绿脓杆菌及肺炎双球菌具有抑菌作用; 银马抗病毒颗粒能降低致病菌对小鼠的死亡率; 银马抗病毒颗粒具有抑制小鼠迟发性免疫反应的作用。结论: 银马抗病毒颗粒具有体外、体内抑菌的作用, 具有抑制迟发性超敏反应的作用。

**关键词** 银马抗病毒颗粒; 抗菌; 迟发性免疫反应

## Experimental Study on Antibacterial Effect and Inhibiting Delayed Type Hypersensitivity Function of Yinma Antiviral Granule

Zhang Junming, Guo Sheng, Fang Lv, Yu Hua, Zhong Xiaoqun, Zhang Aihua

(Jiang Xi Institute of Mater Medica, Nanchang 330029, China)

**Abstract Objective:** To study the antibacterial effect and function of inhibiting delayed type hypersensitivity of Yinma Antiviral Granule. **Methods:** The multiple proportion dilution method in vitro tube was used to observe the antibacterial effect of Yinma Antiviral Granule. Sensitized experiment of in vitro tube was used to observe the function of Yinma Antiviral Granule on delayed type hypersensitivity. **Results:** Yinma Antiviral Granule in concentration of 0.125 g? mL-1 had antibacterial effect in vitro on staphylococcus bacteria, hemolytic streptococcus, group a streptococcus, pseudomonas aeruginosa and pneumococci; Yinma Antiviral Granule reduced mice mortality effected by pathogenic bacteria; Yinma Antiviral Granule inhibited delayed type hypersensitivity on mice. **Conclusion:** Yinma Antiviral Granule has internal and external antibacterial effect and it could inhibit delayed type hypersensitivity function.

**Key Words** Yinma Antiviral Granule; Antibacterial; Delayed type hypersensitivity function

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.07.028