

三七总皂苷对脑出血大鼠凝血酶及神经功能的影响

赵雪松¹ 陈志刚¹ 高 芳¹ 徐枝芳²

(1 北京中医药大学第二附属医院东方医院神经内科, 北京, 100078; 2 日本昭和大学医学部显微解剖教室, 日本, 142-8555)

摘要 目的: 研究三七总皂苷对脑出血大鼠凝血酶及神经功能影响。方法: SD 雄性大鼠 200 只随机分为空白组、假手术组、模型组、用药组, 每组又有 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 天 5 个时间点。空白组每组 5 只, 其余每组每个时间点 10 只大鼠。采用尾壳核注入胶原酶肝素生理盐水溶液法建立大鼠脑出血模型, 治疗组给予三七总皂苷腹腔注射, 每天一次。在相应时间点, 采用改良的神经功能缺损评分 (Modified neurological severity score, mNSS) 对实验动物造模后各时间点神经功能缺损进行评价。结果: 各时间点模型组 mNSS 和空白组假手术组比, 明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 除 6 h 外, 各时间点模型组和用药组比, 用药组 mNSS 明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。测定纤维蛋白原含量和纤维蛋白原凝血时间, 纤维蛋白原含量和纤维蛋白原凝血时间 48 h 模型组和用药组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 脑出血模型组中, 6 h 开始, mNSS 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。纤维蛋白原含量和纤维蛋白原凝血时间在模型组升高, 用药组下降, 说明三七发挥了活血行瘀作用。

关键词 脑出血; 三七总皂苷; 凝血酶; mNSS

Impact of Panax Notoginseng Saponins on the Cerebral Edema of Rats with Coagulation Cascade Pathway via Neurologic Impairment

Zhao Xuesong¹, Chen Zhigang¹, Gao Fang¹, Xu Zhifang²

(1 Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

2 Department of Anatomy, Showa University, School of Medicine, Tokyo, Japan, 142-8555)

Abstract Objective: To investigate the effects of Panax notoginseng saponins (PNS) on the cerebral edema and thrombin in the rats with cerebral hemorrhage (ICH). **Methods:** In present study, 200 SD rats were randomly divided into 4 groups: blank control, sham control, model and PNS treatment groups. ICH was induced by stereotactic injection of the collagenase IV into the right caudate nucleus. PNS or saline was injected intraperitoneally once a day after ICH, and the neurologic impairment was assessed by mNSS method for 5 time points: 6 h, 24 h, 48 h, 72 h and 7 d. Both content of serum fibrinogen (FIB) and Fibrinogen clotting time (FIBs) were measured. **Results:** The score of mNSS increased from 6h ($P < 0.05$) following ICH, and peaked at 48h, then returned to the normal on the 7th day, and the PNS decreased cerebral water content significantly at every examined time points except for 6 h ($P < 0.05$). Moreover, both serum FIB and FIBs increased obviously at 48 h after ICH ($P < 0.05$). The PNS inhibited the increase of both content compared with that in model group (FIB $P = 0.017$, TT $P = 0.028$). **Conclusion:** In rats, the score of mNSS started from 6h following ICH with a peak at 48 hours, and then decreased gradually, accompanied by the elevation of FIB and FIBs at 48h. PNS can effectively alleviate the score of mNSS via the inhibition of coagulation cascade pathway.

Key Words Cerebral hemorrhage (ICH); Panax Notoginseng Saponins (PNS); Thrombin; mNSS

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.11.024

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%^[2], 其复发率约为 1.8% ~ 11%^[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存质量具有重要意义。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^[4], 在血肿形成过程中和形成后, 都存在脑水肿, 在脑水肿发生机制中, 凝血酶的作用受到了广泛关注。它是凝血级联反应的基本成分, 脑出血后迅速生成。脑水肿和凝血酶都具有神经毒性, 破坏神经的正常功能, 本研究通过三七总皂苷对脑出血大鼠凝血酶及神

经功能评分的影响,探讨其对脑出血的治疗作用。

1 资料与方法

1.1 试剂与动物模型的制备

1.1.1 实验动物与分组 SD 雄性大鼠,体重 230 ~ 250 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。大鼠随机分为空白组,假手术组,模型组,用药组四个组,每组又分为 6 h,24 h,48 h,72 h,7 天 5 个时间点。每组每个时间点 10 只大鼠。

1.1.2 主要实验设备及试剂 立体定位仪(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(上海一恒科技有限公司,DHG-9145A 型),离心机(eppendorf Centrifuge 5810R)。微量进样器(上海安亭器械厂)。

1.1.3 动物模型制作与给药 脑出血模型制备参考 Rosenberg 等的方法。以 10% 水合氯醛(0.4 mg/100 g)腹腔麻醉。俯卧固定大鼠于动物头颅立体定位仪,头皮丁字切开,取前囟为原点,向右 3 mm、向后 1 mm、深度 5.5 mm 为注射点(尾壳核),骨钻钻开颅骨,进针后缓慢注射药物溶液,留针 5 min,缓慢退针。切口撒适量青霉素钾粉,缝合皮肤后回笼饲养。空白对照组不做任何处理,普通饲养,自动饮水。假手术组颅内注入 2 μ L 灭菌生理盐水,普通饲养,腹腔注射生理盐水(1 mL/100 g)。模型组注射胶原酶/肝素钠/生理盐水溶液 2.0 μ L(每 1 μ L 溶液含 IV 型胶原酶 0.2 U 及肝素 2 U),普通饲养,腹腔注射生理盐水(1 mL/100 g)。用药组造模同模型组,腹腔注射三七总皂苷注射液(血栓通粉针 150 mg/支)7.2 mg/100 g,于造模后立即给药 1 次,之后每 24 h 给药 1 次。三七总皂苷注射液配置,150 mg 溶入 15 mL 生理盐水中,溶液中含 10 g/mL 血栓通针粉,每 100 g 体重给药 0.72 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 mNSS 评定神经功能 将每组各时间点大鼠在在相应时间点做 mNSS 评分,mNSS,改良神经功能评分,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,具体如下。提尾反射(正常 0 分,最大 3 分)前肢屈曲 1 分;后肢屈曲 1 分;头上抬距垂直轴 >100,且维持在 30 s 之内 1 分。行走测试(正常 0 分,最大 3 分)正常行走 0 分;不能走直线 1 分;向偏瘫侧转圈 2 分;向偏瘫侧倾倒 3 分。感觉测试(正常 0 分,最大 2 分)视觉和触觉

测试 1 分;深感觉测试(拉爪子加强肌肉收缩)1 分。

平衡测试(正常 0 分,最大 6 分)平衡良好 0 分;抓住平衡木的边缘 1 分;悬荡并且一只爪子掉下来 2 分;悬荡并且两只爪子掉下来或者在平衡木上旋转(>60 s)3 分;试图在平衡木上保持平衡但失败(>40 s)4 分;试图在平衡木上保持平衡但失败(>20 s)5 分;掉下来,没有试图在平衡木上保持平衡 6 分。

反射缺失和反常运动(正常 0 分,最大 4 分)耳廓反射(当耳廓被触动时,头晃动)1 分;角膜反射(当用棉花轻触角膜时,眼睛眨动)1 分;惊吓反射(噪音引起的运动反应)1 分;抓握、肌阵挛、肌张力障碍 1 分。最大得分 18 分。

1.2.2 取血及凝血酶测定 将每组各时间点大鼠在在相应时间点麻醉,剪开腹腔,分离出腹主动脉,用一次性采血针和枸橼酸钠抗凝管采血,采出血后,上下缓慢混匀,然后迅速插入冰里,准备离心,离心条件是 40C3000 转离心 10 min,取上清分装备用。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件包进行数据分析,各组数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mNSS 评分测定 空白组由于没有干预,所以没有神经功能障碍,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,同假手术组相比,有明显差异($P < 0.05$);治疗组运动、感觉、平衡以及反射四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 1。

表 1 脑出血三七总皂苷治疗后 mNSS 评分的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	24 h	48 h	72 h	7 d
空白对照组	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
假手术组	1.50 $\pm$ 0.71	0.3 $\pm$ 0.48	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
模型组	6.30 $\pm$ 0.95	10.0 $\pm$ 1.25	12.5 $\pm$ 1.51	12.0 $\pm$ 0.67	8.30 $\pm$ 0.67
用药组	5.90 $\pm$ 0.74 *	8.10 $\pm$ 0.74 *	10.9 $\pm$ 0.86 *	9.5 $\pm$ 0.71 *	5.70 $\pm$ 0.82 *
P	0.247	0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 三七总皂苷治疗后血浆中 FIB 和 FIBs 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	FIB(g/L)	FIBs(s)
假手术组	3	3.65 $\pm$ 0.85	5.17 $\pm$ 0.95
模型组	3	5.40 $\pm$ 0.84 *	3.63 $\pm$ 0.51 *
用药组	3	3.17 $\pm$ 0.81 *	5.87 $\pm$ 1.25 *
P		0.017	0.028

注:模型组和用药组相比,* $P < 0.05$ 。

2.2 凝血酶测定 取 48 h 血浆测凝血酶相关指标,

选取纤维蛋白原含量 (FIB) 和纤维蛋白原凝血时间 (FIBs) 两个指标检测。见表 2。

3 讨论

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、炎性反应、细胞凋亡、氧自由基和补体级联反应等^[4],各种机制之间又存在千丝万缕的关联。ICH 后最初的损伤是由血肿扩大导致机械性压力所造成的;在血肿形成过程中和形成后,都存在水肿,造成了对脑组织的进一步损伤^[4]。在脑水肿发生机制中,凝血酶的作用受到了广泛关注。它是凝血级联反应的基本成分,脑出血后迅速生成。早期水肿的形成牵涉到凝血级联反应的激活和凝血酶的产生,后期则主要是凝血酶引起的血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)破坏所致的血源性水肿。凝血酶是一种血清丝氨酸蛋白酶,由无活性的凝血酶原产生,催化纤维蛋白原转变为纤维蛋白。凝血酶神经作用机制较为复杂,凝血酶^[5]参与凝血,引起血小板聚集分泌、血栓素的形成和平滑肌收缩;凝血酶与内皮细胞快速结合,刺激内皮细胞释放血小板活化因子、内皮素、前列腺素和内皮源性松弛因子。在脑出血后除参与凝血外,还是一种重要的神经毒性递质,它能引起脑水肿,破坏血脑屏障和产生细胞毒性作用,引起神经元损伤。vaughan 等人^[6]研究发现小剂量凝血酶产生神经保护作用,大剂量则具有细胞毒性作用。当出血破入大脑后,主要由外源性凝血途径产生大剂量凝血酶,持续直至凝血酶原耗尽,依次激活产生脑水肿的途径^[7]。凝血酶对神经细胞的毒性作用以及对血脑屏障的损伤可能是脑出血后脑水肿加重的重要机制。凝血酶本身和凝血过程中产生的一系列物质及脑水肿是引起脑损伤和神经功能缺损的重要因素。

ICH 属中医“中风”范畴,传统医学观点认为,中风皆由内因所致,是在气血阴阳失调基础上,风、火、痰、瘀等多种因素共同作用于人体,导致脏腑功能失调,气血逆乱于脑部而发生的。其病位在脑,病性多为本虚标实、上盛下虚。脑出血后机体发生复杂的病理机制,“离经之血即为瘀”,出血性中风属“离经之血,瘀于脑府”,以络破血瘀贯穿发病全过程。发病之初,脑络损而血溢,离经之血为瘀血,血行不畅,损伤脑络、脑髓,进一步加重了出血和血瘀。一定程度上,“瘀血”病机与凝血、炎性反应、脑水肿、组织缺血等病理机制是相吻合的。现代医学影像呈现异常密度影,表明出血性中风为“恶血留内”,治疗应以活血化瘀为第一要义,

瘀血是痰、热、毒的源头,故需澄其源。

三七具有“止血不留瘀”的特点,三七的活性成分三七总皂苷,研究表明可改善血肿周围微循环、降低血脑屏障通透性、清除自由基、减轻脑水肿以治疗出血性中风。故选择与凝血及脑水肿密切相关且之间又相互关联的凝血因子为切入点,进行活血化瘀法治疗脑出血模型作用机制的研究。三七作为活血化瘀法的代表药物,具化瘀止血,活血定痛之功效,止血且不留瘀,适用于 ICH 血肿形成、继发缺血及局部代谢障碍等形成的瘀血症,其主要有效成分为三七总皂苷。三七总皂苷针剂成分较单一,已长期运用于临床,作为本次活血化瘀法的研究药物,以探讨 ICH 用药后对脑出血大鼠凝血酶及神经缺损评分的影响。实验研究表明,三七总皂苷可以改善脑出血周围脑组织凝血酶的表达从而起到脑保护作用,可以改善神经缺损起到脑保护作用,为活血化瘀药物用于治疗脑出血提供可靠的实验基础,并进一步探讨脑组织保护作用的机制。

本研究表明,大鼠脑出血模型制作后,6 h 开始, mNSS 评分明显升高,到 48 h 达到高峰,以后逐渐下降。三七总皂苷腹腔给药后,6 h 组作用不明显,可能与药物作用时间段有关系,其余时间点,给药后 mNSS 评分明显下降,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基础。纤维蛋白原含量在用药后下降,纤维蛋白原凝血时间在用药后变长,说明血液中纤维蛋白原减少,三七发挥了活血行瘀的作用,为临床用活血化瘀法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 pronemice [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, Burgalassi L, DAndrea P, et al. Recurrence of bleeding in patients with Primarily intracerebral hemorrhage. 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] 郑国庆. 凝血酶在脑出血后的作用 [J]. 心脑血管病防治, 2004, 6(4): 56 - 58.
- [6] Vaughan PJ, Pike CJ, Cotman CW, et al. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death Produced by environmental insults. J Neurosci, 1995, 15(7): 5389 - 5401.
- [7] 吴文辉, 许丽珍. 凝血酶致脑水肿的实验观察 [J]. 中国血液流变学杂志, 2003, 13(2): 133 - 134.

(2013 - 06 - 21 收稿)