

回神颗粒减轻中度创伤性脑损伤大鼠脑内炎症反应的机制

崔俊波^{1,2} 指导:陈宝贵²

(1 中国中医科学院博士后科研流动站,北京,100700; 2 天津中医药大学附属武清中医院,天津,301700)

摘要 目的:探讨回神颗粒减轻中度创伤性脑损伤(Traumatic Brain Injury, TBI)后脑内炎症反应的作用环节。方法:应用液压性脑损伤装置建立中度 TBI 模型,创伤压力为 (170 ± 10) kPa,作用时间为 (20 ± 2) ms,随机将大鼠分为 6 组:正常组、假手术组、模型 3 d 组、模型 7 d 组、治疗 3 d 组、治疗 7 d 组。治疗 3 d 组和治疗 7 d 组于创伤后即刻用 2 mL 药液(含回神颗粒 0.27 g)灌胃 1 次,此后再分别于每日早晚各灌胃 1 次,每次 2 mL 药液。采用 RT-PCR 检测 6 组动物损伤区脑组织内 ICAM-1 的变化。结果:与正常组比较:模型 3 d 组、模型 7 d 组、治疗 3 d 组 ICAM-1 的表达明显升高,具有统计学意义($P < 0.01$);治疗 7 d 组 ICAM-1 的表达的升高无统计学意义($P > 0.05$)。治疗 3 d 组 ICAM-1 的表达较模型 3 d 组明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);治疗 7 d 组 ICAM-1 的表达与模型 7 d 组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:回神颗粒通过从转录水平抑制 ICAM-1 的表达,进而减轻脑内炎症反应,避免 TBI 后脑损伤的进一步加重。

关键词 创伤性脑损伤;继发性脑损伤;脑内炎症反应;中性粒细胞;细胞间黏附分子-1;回神颗粒

The Mechanism of Huishen Granule Alleviating Intracerebral Inflammatory Response on Moderate Traumatic Brain Rats

Cui Junbo^{1,2}, Chen Baogui²

(1 Post Doctoral Research Station in Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2 Wu Qing TCM Hospital Affiliated to Tianjin University of TCM, Tianjin 301700, China)

Abstract Objective: This research aims to investigate the mechanism of Huishen Granule alleviating intracerebral inflammatory response in rats with traumatic injury (TBI). **Methods:** Using the equipment of fluid percussion injury (FPI) to establish moderate FPI model in SD rats. The traumatic pressure was (170 ± 10) kPa, traumatic time was (20 ± 2) ms. Randomly divided rats into 6 groups: normal group, sham group, model 3 day group, model 7 day group, experimental 3 day group, experimental 7 day group. Experimental 3 day group and experimental 7 day group were given 2 mL fluid (contain 0.27 g Huishen Granule) into rats' stomach instantly after trauma, and then given 2 mL fluid in the morning and at night. Using real-time polymerization chain reaction (RT-PCR) to examine the change of ICAM-1 in all 6 groups. **Results:** Compared with normal group, the ICAM-1 of model 3 day group, model 7 day group and experimental 3 day group increased obviously ($P < 0.01$). However, compared with model 3 day group, the ICAM-1 of experimental 3 day group descended significantly ($P < 0.05$). Compared with model 7 day group, the ICAM-1 of experimental 7 day group declined obviously ($P < 0.05$). **Conclusion:** The mechanism of Huishen Granule alleviating intracerebral inflammatory response was through prohibiting the expression of ICAM-1 and avoid aggravation of TBI.

Key Words Traumatic brain injury; Secondary brain injury; Intracerebral inflammatory response; Polymorphonuclear leukocyte; ICAM-1; Huishengranule

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.03.036

脑内炎症损伤在创伤性脑损伤(Traumatic Brain Injury, TBI)后继发性脑损伤(Secondary Brain Injury, SBI)发展中的作用受到重视,炎症反应参与脑创伤后 SBI 及损伤修复阶段。TBI 后脑内炎症反应的特征表现为脑内中性粒细胞的出现、聚集和浸润^[1]。但由于血脑屏障的存在,循环中的中性粒细胞聚集

和浸润到损伤灶的脑组织内,首先必须中性粒细胞黏附到血管内皮,而这个过程需要黏附分子细胞间黏附分子(Intercellular Adhesion Molecule, ICAM)的表达上调^[2]。故 ICAM-1 水平是评价颅脑损伤早期炎症反应损伤程度的重要指标,其变化水平与伤情严重程度密切相关^[3]。本实验采用中度 TBI 大鼠模

基金项目:全国名老中医传承工作室建设项目[编号:国中医药人教发(2011)41];全国中医药传承博士后资助项目[编号:国中医药人教函(2013)240号];天津市“131”创新型人才第一层次人选培养工程[编号:津人才(2013)9]

作者简介:崔俊波(1976—),男,汉族,河南郑州人,医学博士,全国首批中医药传承在站博士后,天津市“131”创新型人才培养工程第一层次人选,副主任医师,硕士研究生导师,陈宝贵名中医工作室主任,研究方向:中西医结合治疗脑病研究及名中医学术经验继承应用工作, Tel: (022)29338845 转 7906, E-mail: clevertwins@163.com

型,观察回神颗粒对中度 TBI 后 ICAM-1 含量的影响,探讨回神颗粒减轻脑内炎性反应,避免 TBI 后脑损伤加重的作用环节。

1 材料与方法

1.1 动物来源及分组 SPF 级、雄性 SD 大鼠 50 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证编号:SCXK(京)2002-0003。体重(320 ± 10)g,实验大鼠于动物室内分开笼中喂养,室内温度为(17 ± 3)℃,湿度为(50 ± 20)%,每日光照 12 h,并提供约 50 g 全营养鼠粮及足量清洁饮水。SPSS 软件随机分为 6 组:正常组和假手术组各 7 只;模型 3 d 组、模型 7 d 组、治疗 3 d 组、治疗 7 d 组均为每组 9 只。

1.2 主要仪器和试剂 主要包括:液压颅脑损伤装置、动物立体定位头架、荧光定量 PCR 扩增仪、凝胶图像分析系统、荧光定量 PCR 主反应液、胎牛血清等试验器材及耗材。

1.3 颅脑创伤模型的制作 参照崔俊波^[4]等文献中方法,应用液压性创伤性装置(天津环湖医院神经外科研究所提供),调整打击锤角度至 12 度,则产生的压力大小(170 ± 10)kPa,作用时间为(20 ± 2)ms,即可制作中度 TBI 模型,选取造模成功的动物进入试验环节。

1.4 实验处理方法 治疗组:依据回神颗粒(天津市武清区中医医院提供,制剂许可证号为:津 XZ20010039)临床应用剂量:3 次/d $\times$ 10 g/次 = 30 g/d,则标准体重大鼠剂量为 30 g/d $\times$ 0.018 = 0.54 g/d,用 4 mL 生理盐水稀释成药液,并于创伤后即刻用 2 mL 药液灌胃 1 次,其后再分别于每日早晚各灌胃 1 次,2 mL/次药液。模型组:用 4 mL 生理盐水,分早晚 2 次灌胃。

1.5 取材时间及方法 模型 3 d 组、治疗 3 d 组于损伤后 3 d 处死动物;假手术组、模型 7 d 组、治疗 7 d 组于损伤后 7 d 处死动物;正常组动物处死时间同假手术组。每组各取 6 只动物取脑。取脑方法:大鼠取俯卧位,沿颅顶正中中线从枕后部直至鼻尖切开大鼠头皮,暴露大鼠颅骨。用拆线剪在枕后横断颈椎,从椎管内沿正中中线向前剪开枕骨至后囟。再以拆线剪沿正中中线剪开鼻骨、额骨至前囟,轻轻打开颅腔,暴露出大鼠脑组织。用剪刀轻轻将与脑组织相连的脑膜剪除。将鼠脑取出,选取损伤区脑组织约 400 mg 并立即投入液氮中,RT-PCR 检测时使用。

1.6 RT-PCR 检测 ICAM-1 及标准曲线的制备^[5]

取无菌留取的大鼠脑组织 100 mg 以 Trizol 一步法提取总 RNA,采用荧光定量 RT-PCR 技术对逆转录扩

增产物进行定量分析。PRIMER5.0 设计 ICAM-1 的引物序列,5'-GTGGGCAAGAACCTCATCCT 3'(正义链),5'-CTGGCGGCTCAGTGTCTCATT-3'(反义链),扩增片断约 103 bp。在延伸过程中搜集荧光信号,于每次扩增的同时设置无 cDNA 的阴性对照。结果由 FTC-2000 型荧光定量 RT-PCR 仪(上海,枫岭生物技术有限公司)自带分析软件进行分析。将 ICAM-1 的 PCR 扩增片段回收,连接于 PMD-18T 载体,转化 DH5 α 感受态细胞中,培养后再 PCR 鉴定,大量培养含阳性片段的重组克隆,减法提取重组质粒并纯化,测 OD 值计算浓度,并进行倍比稀释的荧光定量 PCR,最终确定 ICAM-1 的标准曲线。

1.7 统计学方法及数据处理 统计学处理使用 SPSS 11.5 统计软件。ICAM-1 以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。ICAM-1 的 2 组间差异显著性采用 2 个独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 作为有无统计学意义的界限。

2 结果

2.1 ICAM-1 的扩增曲线、融解曲线、标准曲线 见图 1 - 图 3。

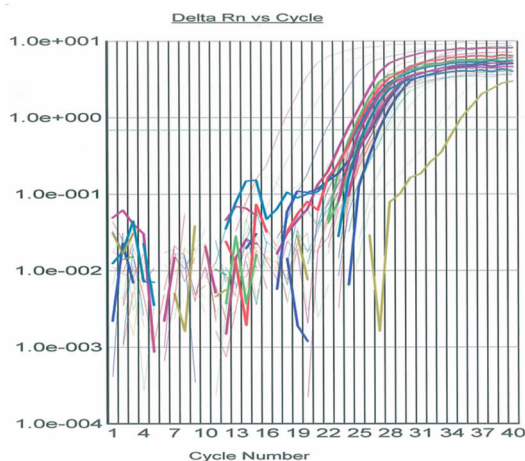


图 1 ICAM-1 的扩增曲线

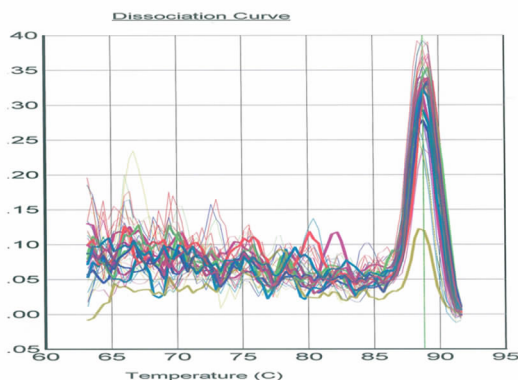


图 2 ICAM-1 的融解曲线

2.2 ICAM-1 的数值结果 与正常组比较:模型 3 d

组、模型 7 d 组、治疗 3 d 组 ICAM-1 的表达明显升高,具有统计学意义($P<0.01$);治疗 7 d 组 ICAM-1 的表达的升高无统计学意义($P>0.05$)。治疗 3 d 组 ICAM-1 的表达较模型 3 d 组明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);治疗 7 d 组 ICAM-1 的表达与模型 7 d 组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

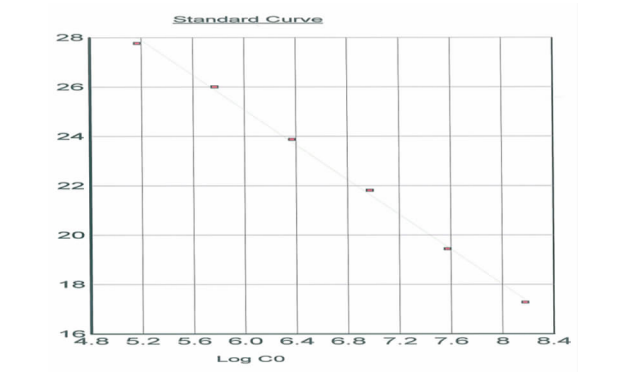


图 3 ICAM-1 的标准曲线

表 1 补气化瘀开窍法对 TBI 大鼠 ICAM-1mRNA 的影响			
组别	例数	TBI3d ICAM-1mRNA	TBI7d ICAM-1mRNA
正常组	6	1.1246 ± 0.0059	1.1246 ± 0.0059
假手术组	6		1.1300 ± 0.0412
模型 3 d 组	6	1.1623 ± 0.0164 ** Δ	
模型 7 d 组	6		1.1565 ± 0.0168 ** Δ
治疗 3 d 组	6	1.1418 ± 0.0124 **	
治疗 7 d 组	6		1.1335 ± 0.0140

注:与正常组比较, ** $P<0.01$,与同期治疗组比较, Δ $P<0.05$ 。

3 讨论

ICAM-1 又称 CD54,是黏附分子免疫球蛋白超家族中的一种单链跨膜糖蛋白。正常情况下中枢神经系统中,包括脑血管内皮细胞的表达的水平很低,但在神经疾病中,由于多种炎症反应递质和细胞因子以及应激反应、缺氧和缺血再灌注等因素刺激下, ICAM-1 表达明显升高^[6]。Knoblach 等^[7]通过大鼠尾静脉注射抗 ICAM-1 的抗体可以减轻外伤性炎症反应,减少中性粒细胞的活性,促进运动功能恢复。刘刚^[8]等发现大鼠颅脑损伤后 ICAM1 表达随时间变化,很可能在颅脑损伤修复中发挥重要功能,且对颅脑损伤的早期判定具有重要意义。本实验发现两个模型组及治疗 3 d 组损伤区脑组织中的 ICAM-1mRNA 表达量均较正常组显著增加($P<0.01$),但两个治疗组损伤区脑组织中的 ICAM-1mRNA 表达量均明显低于相对应的模型组($P<0.05$),且经过应用回神颗粒治疗 7 d 后,治疗 7 d 组损伤区脑组织中的 ICAM-1mRNA 表达量明显降低,与正常组比较无显著增加($P<0.01$)。显示 TBI 后早期应用回神

颗粒导致损伤区脑组织中 ICAM-1mRNA 水平的表达显著减少,表明回神颗粒能从转录水平抑制 ICAM-1 的表达,进而减轻脑内炎症反应,避免 TBI 后脑损伤的进一步加重。

现代药理研究表明^[9]:丹参能够明显改善微循环,加速血流;川芎在体外对由胶原和凝血酶诱导的家兔血小板聚集有显著抑制作用,并可使已聚集的血小板迅速解聚,进而阻止中性粒细胞堵塞微血管,避免血栓形成;五味子酚可使大鼠中性粒细胞表面的伪足和皱褶消失,减少中性粒细胞在内皮细胞的附着和浸润,而具有调节中性粒细胞功能的作用。既往研究证实回神颗粒能够提高脑缺血大鼠模型脑组织 SOD 含量,降低 MDA 含量而减轻自由基对脑细胞的损害。故回神颗粒减轻 TBI 后损伤区脑组织中的炎症反应所介导的 SBI 的机制可能包括:1)降低伤灶区脑组织中 ICAM-1mRNA 水平的表达,进而减少伤灶区脑组织中的中性粒细胞的积聚和浸润;2)改善微循环,阻止 ICAM-1 激活的中性粒细胞堵塞微血管,避免血栓形成;3)减轻 ICAM-1 激活的中性粒细胞释放的大量自由基导致的脑损害。

参考文献

[1] Becker KJ. Targeting the central nervous system inflammatory response in ischemic stroke[J]. Curr Opin Neurol, 2001, 14(3):349-353.

[2] Whalen MJ, Carlos TM, Dixon CE, et al. Reduced brain edema after traumatic brain injury in mice deficient in P-selectin and intercellular adhesion molecule-1[J]. Leukoc Biol, 2000, 67(2):160-168.

[3] 杨梦心,何柯新,麦静雯. 颅脑损伤患者血清 3 项水平的变化及意义[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(13):1813-1815.

[4] 崔俊波,梁建伟,陈宝贵. 中度液压性创伤性脑损伤模型的建立与评估[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9):2375-2376.

[5] 王翀,朱贤立,赵洪洋,等. 细胞黏附分子(ICAM-1)在大鼠弥漫性脑损伤中的表达意义[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2006, 11(2):71-74.

[6] Isaksson J, Lewen A, Hillered L, et al. Up-regulation of intercellular adhesion molecular 1 in cerebral microvessels after cortical contusion trauma in a rat model[J]. Acta Neuropathol(Berl), 1997, 94(1):16-20.

[7] Knoblach SM, Faden AI. Administration of either anti-intercellular adhesion molecule-1 or a nonspecific control antibody improves recovery after traumatic brain injury in the rat[J]. Neurotrauma, 2002, 30(19):1039-1050.

[8] 刘刚,李畅,任强,等. 大鼠颅脑损伤后 ICAM-1 在神经细胞中表达谱及其意义[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(22):6425-6426.

[9] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草精选本[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1998: 10, 169-179, 2194-2200, 2522-2525.