

· 实验研究 ·

# 丹红注射液对实验性脑出血大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、CRP、IL-6 水平的影响

宁培云, 赵洪勇, 赵志超

清远市中医院颅脑外科, 广东 清远 511500

**摘要:** **目的** 观察丹红注射液对实验性脑出血大鼠神经功能评分和血清 TNF- $\alpha$ 、CRP、IL-6 水平的影响, 探讨其保护神经功能的可能机制。 **方法** 30 只健康 Wistar 雄性大鼠随机分为假手术组、模型组和丹红组。运用颅内自身动脉血注入法建立脑出血大鼠模型, 假手术组只进针不注血, 丹红组造模前后予腹腔注射丹红注射液 ( $2\text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 假手术组和模型组予腹腔注射生理盐水  $2\text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 均 1 次/24 h。分别于实验 1、3、5 和 7 d 以 ELISA 法测定血清肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$ 、白介素 (IL)-6)、C-反应蛋白 (CRP) 的水平。按 Berderson 标准, 于术前和术后行神经功能缺损评分。 **结果** 模型组和丹红组神经功能缺损评分及 TNF- $\alpha$ 、CRP、IL-6 水平明显高于假手术组 ( $P$  均  $<0.05$ ), 丹红组神经功能缺损评分及 TNF- $\alpha$ 、CRP、IL-6 水平明显低于模型组 ( $P$  均  $<0.05$ )。 **结论** 丹红注射液有保护脑出血大鼠神经功能的作用, 可能与降低 TNF- $\alpha$ 、IL-6、CRP 在血清中的释放有关。

**关键词:** 脑出血; 大鼠; 丹红注射液; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; C-反应蛋白; 白介素-6

**中图分类号:** R-33 R 743.34 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2017)07-0971-03

急性高血压性脑出血 (ICH) 是神经科常见的急危重症, 具有进展快、致残率高、病死率高的特点<sup>[1]</sup>。我国 ICH 发病率仅次于缺血性脑卒中, 居第 2 位, 占所有脑血管病的 18.8%~47.6%<sup>[2]</sup>, 1 个月内病死率高达 35%~52%<sup>[2]</sup>, 6 个月内仍有 80% 存活者致残, 是我国居民致残、致死的最主要原因。脑出血后继发性神经损伤是影响预后的重要因素, 而炎症反应是继发性神经损伤的重要机制之一<sup>[3]</sup>。因此, 如何有效地降低脑出血后神经功能缺损、抑制脑出血后的炎症反应, 已经越来越受到重视。近年来, 活血化瘀中成药用于脑出血急性期取得良好疗效, 但对其保护脑神经的作用机制尚不明确。本研究建立脑出血大鼠模型, 并用丹红注射液进行干预, 以探讨其是否通过抑制炎症反应来保护脑出血大鼠的神经功能。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与材料** 健康 SPF 雄性 Wistar 大鼠 30 只, 体重 250~300 ( $275 \pm 20$ ) g, 由广州花都东信华实验动物有限公司提供 (许可证号为 SYXK (粤) 2014-0023); 丹红注射液 (陕西菏泽步长制药, 20 ml/支, 批号: 1612246); 大鼠血清 C 反应蛋白 (CRP)、肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$  测定试剂盒 (TSZ 公司)、大鼠血清白介素 (IL)-6 测定试剂盒 (IBL 公司)。

**1.2 大鼠脑出血模型建立与处理** 大鼠造模前先适应性喂养 7 d, 待其代谢状态稳定后随机分为正常假手术组 ( $n=10$ )、模型组 ( $n=10$ ) 和丹红组 ( $n=10$ ), 每只分笼喂养。参照改良的自体尾动脉血两次注血法制作脑出血模型<sup>[4-5]</sup>, 水合氯醛 ( $35\text{ mg/kg}$ ) 腹腔注射液麻醉后, 立体定向仪固定, 用直径 1 mm 的牙科钻在前囟点右旁 3.5 mm 和后 0.2 mm 交点处钻至硬脑膜, 留静脉留置针。尾动脉采血 50  $\mu\text{l}$ , 进针至尾状核, 先注入 10  $\mu\text{l}$ , 停针 2 min, 再缓慢注入 40  $\mu\text{l}$ , 留针 4 min, 退针 2 cm, 再停针 4 min, 缓慢出针。术后用牙科水泥封闭骨孔, 缝合头部皮肤。假手术组操作与模型组相同, 但不注血。丹红注射液组分别在术前 24 h 和术后予腹腔注射丹红注射液, 剂量  $2\text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 1 次/24 h, 直至死亡为止。假手术组和模型组分别在术前 24 h 和术后予腹腔注射生理盐水, 剂量  $2\text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 1 次/24 h, 直至死亡为止。

**1.3 实验室指标** 采血前禁食不禁饮 10 h, 分别在实验第 1、3、5 和 7 d 经尾静脉取血, 运用 ELISA 法检测血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、CRP 的水平 (由金域医学检验中心有限公司按照试剂盒说明书步骤进行检测)。

**1.4 神经功能缺损评分** 参照 Berderson 标准, 于术前和术后行神经功能缺损评分。0 分: 无体征; 1 分: 动物脑部病灶对侧腕关节、肘关节屈曲, 肩内收屈曲; 2 分: 上述体征加向麻痹侧推阻力下降; 3 分: 活动时向麻痹侧追尾; 4 分: 意识障碍, 无自发运动。

**1.5 统计学方法** 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分

析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠神经功能缺损评分比较 造模前所有大鼠无神经功能缺损表现。造模后模型组和丹红组所有大鼠均可见明显神经功能障碍,表现为病灶对侧肢体偏瘫,有追尾现象,病灶对侧上肢不能完全伸直、呈屈曲状态,后肢向后外展。1 d 时神经功能缺损最严重,大部分大鼠不能站立,之后神经功能缺损程度逐渐减轻。在各时间点,模型组大鼠神经功能缺损评分明显升高;而丹红组逐渐降低,且明显低于模型组( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 1。

2.2 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$  水平比较 手术后,模型组血清 TNF- $\alpha$  水平逐渐升高,至 3 d 时达到高峰后逐渐回落,且在实验 1、3、5 和 7 d 时均明显高于假手术组( $P$  均  $< 0.05$ );丹红组血清 TNF- $\alpha$  水平有所下降,且在实验 1、3、5 和 7 d 时均明显低于模型组( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 1。

2.3 各组大鼠血清 CRP 水平比较 手术后,模型组血清 CRP 水平逐渐升高,至 3 d 时达到高峰后逐渐回落,且在实验 1、3、5 和 7 d 时均明显高于假手术组( $P < 0.05$ );丹红组血清 CRP 水平有所下降,且在 1、3、5 和 7 d 时,均明显低于模型组( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 1。

2.4 各组大鼠血清 IL-6 水平比较 手术后,模型组血清 IL-6 水平逐渐升高,至 3 d 时达到高峰后逐渐回落,且在实验 1、3、5 和 7 d 时均明显高于假手术组

( $P < 0.05$ );丹红组血清 IL-6 水平有所下降,且在实验 1、3、5 和 7 d 时均明显低于模型组( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 1。

3 讨 论

脑出血是神经内外科常见的难治性疾病之一,是我国乃至全球范围内致残、致死的最主要的原因之一<sup>[6-7]</sup>,其常见的病因有高血压、脑血管畸形、动脉瘤、动脉硬化等<sup>[8]</sup>。流行病学调查研究显示,脑出血发病率仅次于缺血性脑卒中,居第 2 位,发病率约为 10/10 万人年~15/10 万人年。关于脑出血的发病机制尚不明确,但是近年来炎症反应在脑出血病理生理中的重要性越来越受到重视。影响脑出血患者预后的主要因素是脑实质出血形成血肿压迫脑组织,直接损伤脑组织或导致脑组织缺血缺氧而出现神经功能障碍,同时局部或全身的炎症反应是继发性脑损伤的重要原因。

有研究指出炎症反应与脑出血的预后密切相关<sup>[9]</sup>,TNF- $\alpha$ 、CRP 和 IL-6 是三个重要的炎症介质。TNF- $\alpha$  是一种具有多重生物活性的多肽类细胞因子,主要由单核巨噬细胞和 T 淋巴细胞以及神经系统中的星形细胞和小胶质细胞生成,是炎症反应和免疫应答的重要介质<sup>[10]</sup>。脑出血继发性脑组织缺血缺氧,产生大量的抗原物质,刺激单核巨噬细胞和 T 淋巴细胞产生大量的 TNF- $\alpha$ <sup>[11]</sup>,TNF- $\alpha$  刺激内皮细胞和巨噬细胞等产生 IL-1 等黏附因子,引发“瀑布”级联反应,导致持久的炎症反应加重神经损伤<sup>[12]</sup>;同时刺激内皮素生成,导致血管收缩和促进凝血,进而使局部脑缺血缺氧加重<sup>[13]</sup>;TNF- $\alpha$  还可以损害血管内皮细胞,使血脑屏障开放,使外周炎症介质浸润和脑水肿加重;最后 TNF- $\alpha$  可以直接促进脑细胞凋亡<sup>[14]</sup>。CRP 是急性时相反应蛋白之一,主要在肝脏合成,正常情况下血清含量极少,当体内发生炎症时迅速释放升高,且其浓度与炎症严重程度呈正比<sup>[15]</sup>。有研究指出,血管斑块存在 CRP,可以损伤内皮细胞,使血管脆性增加,进而血管破裂发生脑出血<sup>[16]</sup>。IL-6 是研究较多的炎症因子,主要由单核巨噬细胞、T 淋巴细胞、内皮细胞等产生,其效应与浓度相关,当 IL-6 浓度较低时,具有神经修复的作用,当脑出血后 IL-6 浓度急剧增加时,参与继发性神经损伤的病理生理过程,因此脑出血后 IL-6 升高提示炎症加重<sup>[17-18]</sup>。一项荟萃分析研究结果表明血清 IL-6 是脑出血后神经损伤加重的独立危险因素。Dziedzic<sup>[19]</sup> 发现脑出血患者血清 IL-6 与患者的预后呈负相关。

近年来,活血化瘀类中药应用于脑出血急性期得

| 表 1 各组大鼠神经功能缺损评分及炎症指标比较    |                                |                                |                                |                                |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| (n = 10, $\bar{x} \pm s$ ) |                                |                                |                                |                                |
| 组别                         | 1 d                            | 3 d                            | 5 d                            | 7 d                            |
| 神经功能缺损评分                   |                                |                                |                                |                                |
| 假手术组                       | -                              | -                              | -                              | -                              |
| 模型组                        | 3.48 $\pm$ 0.23                | 3.29 $\pm$ 0.21                | 3.06 $\pm$ 0.19                | 2.86 $\pm$ 0.15                |
| 丹红组                        | 3.01 $\pm$ 0.18 <sup>#</sup>   | 2.79 $\pm$ 0.21 <sup>#</sup>   | 2.54 $\pm$ 0.17 <sup>#</sup>   | 2.32 $\pm$ 0.19 <sup>#</sup>   |
| 血清 TNF- $\alpha$ (ng/L)    |                                |                                |                                |                                |
| 假手术组                       | 1.22 $\pm$ 0.08                | 1.34 $\pm$ 0.12                | 1.24 $\pm$ 0.10                | 1.20 $\pm$ 0.09                |
| 模型组                        | 2.87 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>   | 3.16 $\pm$ 0.14 <sup>*</sup>   | 3.10 $\pm$ 0.11 <sup>*</sup>   | 2.99 $\pm$ 0.16 <sup>*</sup>   |
| 丹红组                        | 2.14 $\pm$ 0.10 <sup>**</sup>  | 2.32 $\pm$ 0.21 <sup>**</sup>  | 2.12 $\pm$ 0.27 <sup>**</sup>  | 1.98 $\pm$ 0.24 <sup>**</sup>  |
| 血清 CRP (mg/L)              |                                |                                |                                |                                |
| 假手术组                       | 9.68 $\pm$ 2.18                | 13.65 $\pm$ 2.45               | 12.32 $\pm$ 3.10               | 10.75 $\pm$ 2.47               |
| 模型组                        | 30.25 $\pm$ 1.24 <sup>*</sup>  | 38.24 $\pm$ 2.13 <sup>*</sup>  | 34.56 $\pm$ 2.53 <sup>*</sup>  | 30.34 $\pm$ 3.12 <sup>*</sup>  |
| 丹红组                        | 22.65 $\pm$ 4.12 <sup>**</sup> | 24.36 $\pm$ 3.14 <sup>**</sup> | 21.35 $\pm$ 4.10 <sup>**</sup> | 19.36 $\pm$ 2.43 <sup>**</sup> |
| 血清 IL-6 (ng/L)             |                                |                                |                                |                                |
| 假手术组                       | 15.68 $\pm$ 1.35               | 17.34 $\pm$ 1.23               | 15.75 $\pm$ 2.10               | 15.08 $\pm$ 2.13               |
| 模型组                        | 28.96 $\pm$ 2.10 <sup>*</sup>  | 32.42 $\pm$ 1.68 <sup>*</sup>  | 30.12 $\pm$ 3.10 <sup>*</sup>  | 28.79 $\pm$ 4.15 <sup>*</sup>  |
| 丹红组                        | 20.65 $\pm$ 2.14 <sup>**</sup> | 22.69 $\pm$ 2.38 <sup>**</sup> | 21.10 $\pm$ 2.12 <sup>**</sup> | 19.64 $\pm$ 2.23 <sup>**</sup> |

注:与假手术组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

到广泛认可。活血化瘀类中药具有祛除淤血、改善血液循环、抑制炎症反应、促进血肿吸收、改善神经功能缺损症状等作用,并且其存在活血、止血的双向调节作用<sup>[20]</sup>。有专家提出,活血化瘀、利水消肿是急性脑出血最重要的中医治疗法则,早期、足量应用活血化瘀药是改善预后的关键<sup>[21]</sup>。丹红注射液为传统中药丹参和红花经精制提取而制成的静脉注射液,其中丹参具有祛瘀止痛、活血化瘀、清心除烦的作用,红花具有活血化瘀、散郁开结的作用。其主要成分有丹参酮、丹参酸、丹参酚酸及红花黄色素、红花酚苷和儿茶酚等,具有活血化瘀、通脉舒络功效。研究表明,丹红注射液具有抑制血小板聚集、抗炎症损伤、保护血管内皮、抗细胞凋亡的药理作用<sup>[22]</sup>。

本研究采用改良的自体尾动脉血两次注血法制作大鼠脑出血模型,术后各组大鼠均出现一定的神经功能缺损症状,表现为病灶对侧肢体瘫痪、不能站立、追尾等症状,丹红组在实验 1、3、5 和 7 d 时的神经功能评分明显低于模型组,提示丹红注射液可以保护脑出血后神经功能,减轻神经损伤。与假手术组比较,模型组术后 1 d 后 TNF- $\alpha$ 、CRP 和 IL-6 开始升高,至 3 d 时达到高峰后逐渐下降,提示脑出血存在明显的炎症反应,并且在实验 1、3、5 和 7 d 时的血清 TNF- $\alpha$ 、CRP 和 IL-6 明显高于假手术组,说明脑出血后炎症反应增加。丹红组在实验 1、3、5 和 7 d 时的血清 TNF- $\alpha$ 、CRP 和 IL-6 明显低于模型组,提示丹红注射液可以下调血清中 TNF- $\alpha$ 、CRP 和 IL-6 的释放,降低炎症反应,从而减轻继发性脑组织损伤。

综上所述,丹红注射液具有减轻脑出血后神经损伤、保护脑神经的作用,可能与调节血清中 TNF- $\alpha$ 、CRP 和 IL-6 的释放有关。

## 参考文献

- [1] 黎鹏. 高血压脑出血的治疗及进展[J]. 医学综述, 2011, 17(8): 1169 - 1172.
- [2] Steiner T, Bösel J. Options to restrict hematoma expansion after spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. Stroke, 2010, 41(2): 402 - 409.
- [3] 刘佰运. 免疫系统与脑卒中[J]. 国外医学(脑血管疾病分册), 1995(1): 13 - 15.
- [4] 闫峰, 吉训明, 罗玉敏. 多种实验动物脑出血模型的制作[J]. 实验动物科学, 2009, 26(1): 38 - 40, 51.
- [5] Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats [J]. Stroke, 1990, 21(5): 801

- 807.
- [6] 王姝. 超敏 C 反应蛋白在脑出血患者中的变化及醒脑静对其的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(23): 2520 - 2521, 2535.
- [7] 谢青, 宋小慧. 脑卒中康复治疗技术发展史[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2015, 15(3): 177 - 181.
- [8] Budohoski KP, Czosnyka M, Smielewski P, et al. Impairment of cerebral autoregulation predicts delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: a prospective observational study [J]. Stroke, 2012, 43(12): 3230 - 3237.
- [9] 张健, 陈干涛. 急性脑出血患者 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平与预后的关系[J]. 实用癌症杂志, 2012, 27(6): 652, 657.
- [10] 张洁, 郭恒怡. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  在缺血性卒中中的损伤作用[J]. 国外医学(脑血管疾病分册), 2004, 12(8): 597 - 600.
- [11] Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, et al. Glial expression of cytokines in the brains of cerebrovascular disease patients[J]. Acta Neuropathol, 1996, 92(3): 281 - 287.
- [12] Veréb Z, Lumi X, Andjelic S, et al. Functional and molecular characterization of ex vivo cultured epiretinal membrane cells from human proliferative diabetic retinopathy [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 492376.
- [13] 崔向宁, 李玉波, 李妍, 等. 活血、利水中药对脑出血大鼠脑组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、核转录因子- $\kappa$ B 及水通道蛋白-4 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(2): 203 - 208.
- [14] Musumeci M, Sotgiu S, Persichilli S, et al. Role of SH levels and markers of immune response in the stroke [J]. Dis Markers, 2013, 35(3): 141 - 147.
- [15] Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein [J]. Adv Immunol, 1983, 34: 141 - 212.
- [16] Xue M, Del Bigio MR. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and cell death [J]. Neurosci Lett, 2000, 283(3): 230 - 232.
- [17] Vakili H, Ghaderian SM, Akbarzadeh Najari R, et al. Genetic polymorphism of interleukin-6 gene and susceptibility to acute myocardial infarction [J]. Coron Artery Dis, 2011, 22(5): 299 - 305.
- [18] Koh SJ, Jang Y, Hyun YJ, et al. The interleukin-6 - 572C  $\rightarrow$  G promoter polymorphism is associated with Type 2 diabetes risk in Koreans [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2009, 70(2): 238 - 244.
- [19] Dziedzic T. Clinical significance of acute phase reaction in stroke patients [J]. Front Biosci, 2008, 13: 2922 - 2927.
- [20] 孙国柱. 活血化瘀法为主治疗出血性中风急性期 45 例临床观察[J]. 中医杂志, 2002, 43(3): 184 - 185.
- [21] 曹忠义, 高颂. 活血化瘀法对急性脑出血血液流变学及颅内血肿吸收的影响[J]. 中国中医急症, 2001, 10(1): 24 - 24.
- [22] 王硕, 何俗非, 翟静波, 等. 丹红注射液药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(3): 128 - 131.

收稿日期: 2017 - 03 - 08 修回日期: 2017 - 04 - 16 编辑: 周永彬