

甘草酸二胺对大鼠脑出血后脑水肿的疗效研究

付怀栋¹,林福军¹,潘永进²,王秀彬²,杜守云¹

(1.灌云县人民医院神经内科,江苏 灌云 222200;

2.南通大学附属医院神经内科,江苏 南通 226001)

【摘要】 目的 观察甘草酸二胺对大鼠脑出血(Intracerebral hemorrhage, ICH)后脑水肿的疗效。方法 参照 Rosenberg 等报道的方法制备大鼠脑出血模型,术后 24 h 对大鼠进行头颅磁共振(Magnetic resonance, MR)扫描,判断脑出血模型制作是否成功,将模型制作成功大鼠随机分为脑出血模型组、甘草酸二胺治疗组,另设假手术组,所有大鼠第 5 天 MR 扫描后处死,采用干湿重法测定大鼠脑组织含水量,用 ELISA 法测定脑组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)的表达水平。**结果** 脑出血模型组大鼠脑含水量、脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平明显高于假手术组,甘草酸二胺治疗组脑含水量、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 较模型组明显下降($P < 0.01$)。磁共振扫描显示模型组血肿周围水肿范围明显增大,甘草酸二胺治疗组血肿周围未见明显水肿。**结论** 甘草酸二胺能减轻大鼠脑出血后脑水肿,其机制可能与减轻炎症反应有关。

【关键词】 脑出血;甘草酸二胺;炎症因子;脑含水量;磁共振成像

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2012)02-021-03

Efficacy of diammonium glycyrrhizinate in the treatment of cerebral edema after intracerebral hemorrhage in rats. FU Huai-dong¹, LIN Fu-jun¹, PAN Yong-jin², WANG Xiu-bin², DU Shou-yun¹. 1. Department of Neurology, People's Hospital of Guanyun Country, Guanyun 222200, Jiangsu, CHINA; 2. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, 226001, Jiangsu, CHINA

【Abstract】 Objective To observe the efficacy of diammonium glycyrrhizinate in the treatment of cerebral edema after intracerebral hemorrhage (ICH) in rats. **Methods** 24 hours after the ICH model established, MR scanning was performed. The successful models were randomly divided into 2 groups: ICH model group and treated group, and sham-operated group was built up. 5 days after operation, MR scanning was performed firstly, and then the rats were sacrificed to measure the brain water content with wet-dry weight method. The contents of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in the brain tissue were detected with ELISA method. **Results** The contents of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and the water content were reduced in the treated group as compared to ICH group. Perihematoma edema was not found in treated group, but the scope of edema around the hematoma in ICH model group increased. **Conclusion** Diammonium glycyrrhizinate could reduce cerebral edema after ICH in rats, whose mechanisms may be related to resultant alleviation of cerebral inflammatory.

【Key words】 Intracerebral hemorrhage; Diammonium glycyrrhizinate; Inflammatory cytokines; Brain water content; Magnetic resonance imaging

脑出血后引起机体和脑组织局部一系列病理生理变化,在血肿周围的脑组织形成水肿带,继而引起神经细胞及其轴突的变性、坏死,导致病情恶化和影响预后。脑出血后炎症反应在脑水肿和神经损伤过程中起重要作用,且程度较非出血性损伤严重,脑出血后血凝快及受损脑组织可释放多种趋化因子,激活炎性细胞,并使其向血肿及周围脑组织转移,进而导致脑水肿和脑损伤,因此,抑制炎症反应能减轻脑水肿。2010年1月至2011年9月本研究用甘草酸二胺注射液来治疗大鼠脑出血后脑水肿,观察其对脑水肿的治疗作用,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 动物与分组 选取健康成年雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 36 只,体质量 250~300 g,由南通大学实验动物中心提供。分为假手术组、脑出血模型组(模型组)、甘草酸二胺治疗组(治疗组),每组 12 只。

1.2 主要试剂及仪器 甘草酸二胺(50mg/支,江苏天晴);大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、ELISA 试剂盒(深圳欣博盛生物公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物公司);酶标仪(Elx-800,美国 Bio-tek 公司);GE Signa Excite HD 3.0 T MR 机;鼠头立体定位

作者简介:付怀栋(1975—),男,江苏省连云港市人,主治医师,硕士。

仪(上海江湾I型C);电热恒温干燥箱(101 AB-3,海门市恒昌仪器厂)。

1.3 动物模型制备 参照 Rosenberg 等^[1]报道的方法制备大鼠脑出血模型,用10%水合氯醛腹腔麻醉大鼠(350 mg/kg),将其俯卧位固定在立体定位仪上,调节门齿托的高度,使大鼠前囟、后囟处于同一水平,沿头皮正中切一长约10 mm切口,用30%双氧水腐蚀颅骨上腱膜及颅骨外膜,无菌操作暴露前囟,定位于前囟前0.2 mm,中线向右旁开3 mm处钻一直径为1 mm的小孔,进针深度为5.5 mm(即尾壳核位置)。用40℃水温浴大鼠尾巴约5 min后取出擦干,酒精消毒后,在距离大鼠尾巴末端2~3 mm处剪断鼠尾,断尾取血50 μl,用微量进样器在3~4 min内缓慢注入,注血结束后留针10 min后缓慢退针,局部用骨蜡封闭后缝合皮肤。所有操作均在无菌条件下进行,术毕将大鼠放回笼中饲养,自由活动进食进水。假手术组不向脑内注血。术后24 h,治疗组给予甘草酸二胺50 mg/kg腹腔注射,1次/d,模型组给予等量的生理盐水注射,假手术组不做处理。

1.4 头颅MR扫描 大鼠脑出血模型制备24 h,对所有大鼠进行头颅MR扫描,判断脑出血模型是否成功,即在右侧基底节区形成大小一致的血肿,血液没有破入脑室及蛛网膜下腔。第5天对各组大鼠进行扫描,观察血肿大小及血肿周围水肿。扫描序列为,轴位T₂WI:FRFSE-XL/90,TR 5000 ms,TE 85 ms,FOV 9.0 cm×5.4 cm,层厚1mm,间隔0.1,NEX 320/224/2。冠状位T₂WI:FRFSE-XL/90,TR 2 000 ms,TE 85 ms,FOV 8.0 cm×8.0 cm,层厚1 mm,间隔0.1,NEX 320/192/2。

1.5 脑组织含水量测定 各组分别选择6只动物,在冰块上迅速取脑,取出大鼠脑组织(去除表面凝血),将取出的脑组织沿中线分为左右两侧大脑,放在一个内有生理盐水湿润的培养皿中,以防水分蒸发,用电子天平测其湿重,然后于90℃烤箱烘烤72 h至恒重,取出称干重,用干湿法计算含水量:脑含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.6 炎症细胞因子含量测定 每组分别随机选取6只大鼠,断头取脑,在血肿周围取脑组织0.5 g,加生理盐水稀释10倍,用玻璃匀浆器在冰上研磨,制成脑组织匀浆,3 000 r/min离心10 min,取上清液进行超滤离心,最后取上清液进行TNF-α、IL-1β、IL-6含量测定。从已平衡至室温的密封袋中取出所需板条,除空白孔外,分别将匀浆上清液或不同浓度标准品加入相应孔中,先后分别加入生物素化抗体工作

液、酶结合工作液,显色剂之间各洗板4次,最后加入终止液,混匀后即刻测量OD₄₅₀值,最后根据绘制的标准曲线计算各浓度值。

1.7 统计学处理 采用SPSS17.0统计软件处理,数据资料表达采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多个样本均数比较采用单因方差分析(ANOVA),组间均数两两比较用LSD法。

2 结果

2.1 头颅磁共振扫描 大鼠脑出血模型制备24 h后,对所有大鼠进行头颅MRI扫描,模型制作成功的大鼠,可见在右侧基底节区形成大小一致血肿。血液破入脑室或蛛网膜下腔,形成的血肿大小不一致或没形成血肿的大鼠,排除出本试验,重新予以补充。术后第5天对各组大鼠再次进行扫描发现,血肿为低信号,模型组血肿周围可见较大范围的高信号,考虑为脑水肿,而治疗组血肿周围未见明显高信号。

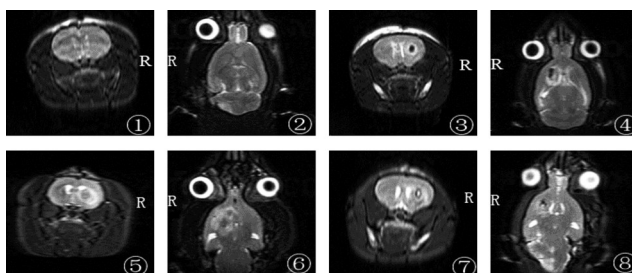


图1 大鼠俯卧位扫描

注:①假手术组大鼠冠状面T₂WI图像;②假手术组大鼠轴面T₂WI图像,图上未见异常信号;③脑出血模型制作成功大鼠冠状面T₂WI图像;④模型制作成功大鼠轴面T₂WI图像,显示右侧基底节区形成类圆形血肿,图上显示为低信号;⑤第5天模型组冠状面T₂WI图像;⑥第5天模型组轴面T₂WI图像,血肿为低信号,血肿周围可见较大范围高信号;⑦第5天治疗组冠状面T₂WI图像;⑧治疗组轴面T₂WI图像,血肿为低信号,血肿周围未见明显高信号。

2.2 脑含水量测定 与假手术组比较,模型组脑组织含水量明显升高(P<0.01)。经甘草酸二胺治疗后,脑组织含水量较模型组明显降低(P<0.01),见表1。

表1 各组脑组织含水量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	脑含水量(%)
假手术组	6	75.59±0.33
模型组	6	78.23±0.39*
治疗组	6	76.16±0.20#

注:与假手术组比较,*P<0.01;与模型组比较,#P<0.01。

2.3 炎症细胞因子含量测定 与假手术组比较,模型组TNF-α、IL-6、IL-1β水平明显升高,与模型组比较,治疗组TNF-α、IL-6、IL-1β水平降低(P<0.01),见表2。

表2 炎性细胞因子水平的比较($\bar{x}\pm s$, ng/g)

组别	动物数(只)	TNF- α	IL-6	IL-1 β
假手术组	6	1.02 \pm 0.44	2.34 \pm 0.54	0.66 \pm 0.23
模型组	6	8.84 \pm 1.04*	7.01 \pm 1.20*	2.20 \pm 0.40*
治疗组	6	5.24 \pm 1.06#	4.24 \pm 0.81#	1.61 \pm 0.29#

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.01$ 。

3 讨论

实验研究不仅需要建立与临床一致的动物模型,还需要有可靠的检测方法来判断模型制作是否成功。王秀彬等^[2]研究显示,用3.0 T MR结合串联线圈为活体大鼠模型的MR检查提供了很好的方法。本研究中,我们应用MR扫描来判断大鼠脑出血模型制作是否成功,MR扫描显示在右侧基底节区形成大小一致血肿的大鼠纳入本实验,血液破入脑室或蛛网膜下腔,排除出本研究,这种方法直观、可靠,克服了以往利用神经行为学检测来判断模型制作是否成功的不确定性、人为干扰因素大等缺点,使制作的模型具有一致性。

在本研究中,我们运用干湿重法测定大鼠脑含水量发现,模型组大鼠脑含水量明显高于假手术组,而甘草酸二胺治疗组脑含水量明显低于模型组,差异有统计学意义,而且头颅MR亦显示模型组大鼠血肿周围有较大范围的高信号,考虑为血肿周围水肿,而治疗组血肿未见明显高信号,这说明甘草酸二胺能减轻大鼠脑出血后脑水肿。

脑出血后炎症反应在脑水肿形成过程中起重要作用,正常脑组织中炎性细胞因子表达极微,但是脑出血后,血凝块及受损脑组织产生大量的炎性细胞因子,研究显示^[3-4],脑出血后血肿冲洗液中炎性细胞因子含量明显增高,而且与脑水肿高峰相一致。脑组织损伤后星形细胞、血管内皮细胞及小胶质细胞首先表达TNF- α ^[5]。崔洁等^[6]研究显示,脑出血后血浆中TNF- α 的浓度出现了明显的增高,随着TNF- α 含量的增高,脑水肿也随之明显加重,这也说明TNF- α 是脑出血后脑水肿发生的重要因素之一。IL-1是促炎症细胞因子,主要由单核巨噬细胞和淋巴细胞产生,可分为 α 、 β 、 γ 三种类型。研究发现,IL-1 β 与脑水肿关系密切,可介导血管内皮通透性增加而加重脑水肿^[7]。IL-6由促炎细胞因子IL-1和TNF- α 刺激产生的, Taupin等^[8]的动物实验证实,脑出血早期IL-6明显增高,而此时正是脑组织损伤、水肿和炎症反应的高峰期,表明IL-6参与了脑出血的继发性脑损伤,IL-6还能激活补体系统产生细胞损害。因此,测定脑出血后

脑组织中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的含量变化可以反映脑组织损伤的程度,可用于反映药物治疗后的效果,本研究发现,甘草酸二胺治疗组脑组织中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量较模型组明显降低,脑水肿程度亦明显减轻,说明甘草酸二胺可以抑制脑损伤后炎症反应,从而减轻脑水肿。

皮质激素可改善血脑屏障的功能,降低毛细血管的通透性,减少脑脊液的生成,改善脑微循环,稳定溶酶体膜等作用,故可用于脑水肿的治疗,但因激素存在严重的副作用,限制了激素的应用。甘草酸二胺是从中药甘草有效成份的第三代提取物,其具有较强的抗炎、解毒、抗过敏、保护肝细胞膜和改善肝功能等作用,该药在化学结构上与醛固酮的类固醇环相似,可阻碍可的松与醛固酮的灭活,从而发挥类固醇样作用,而无皮质激素的不良反应。在本研究中,我们发现甘草酸二胺可以降低大鼠脑出血后脑组织中TNF- α 、IL-1、IL-6的含量,减轻脑水肿,我们推测这可能与甘草酸二胺的皮质激素样作用有关。

虽然基础研究显示甘草酸二胺可以减轻大鼠脑出血后脑水肿,但在临床上是否可以用于脑出血后脑水肿的治疗尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats [J]. Stroke, 1990, 21: 801-807.
- [2] 王秀彬,曹和涛,李敏,等.串联线圈大鼠MR成像的初步应用研究[J].中华放射学杂志,2010,44(9):991-994.
- [3] 李银,李新军.高血压脑出血患者血肿冲洗液IL-1、IL-6及TNF- α 含量的动态变化及意义[J].2008,28(2):155-157.
- [4] 张明伟,彭俊,刘阳.高血压脑出血患者血清和颅内血肿液中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量研究[J].中华神经外科疾病研究杂志,2010,9(2):138-141.
- [5] Mayne M, Ni W, Yan HJ, et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor- α expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage [J]. Stroke, 2001, 32(3): 240.
- [6] 崔洁,王景周,宋钦,等.脑出血大鼠脑水肿与血浆肿瘤坏死因子关系的研究[J].重庆医学,2007,36(13):1244-1245.
- [7] Holmin S, Mathiese T. Intracerebral and administration of interleukin-1 β and induction of inflammation, apoptosis and vasogenic edema [J]. Journal of Neurosurgery, 2000, 92(1): 108-120.
- [8] Taupin V, Toumond S, Serrano A, et al. Increase in IL-6, IL-1 and TNF- α levels in rat brain following traumatic lesion influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (psite) benzodiazepine ligand [J]. Journal of Neuroimmunology, 1993, 42(2): 177-185.

(收稿日期:2011-09-05)