

· 基础研究 ·

# 人参总皂苷对脑损伤大鼠脑组织中炎症细胞因子的影响\*

夏磊<sup>1</sup>, 姜正林<sup>2△</sup>, 王国华<sup>2</sup>, 胡宝英<sup>2</sup>, 高志伟<sup>1</sup>

(1. 南通大学附属医院神经内科, 江苏南通 226001; 2. 南通大学航海医学研究所, 江苏南通 226001)

**摘要:**目的 研究人参总皂苷治疗对脑损伤大鼠脑组织中促炎因子——肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)及抗炎因子——白介素-10(IL-10)的影响,探讨人参总皂苷治疗脑损伤的作用机制。方法 运用改良 Feeney 法建立大鼠脑损伤模型,将动物随机分为假手术组、脑损伤组、人参总皂苷治疗组。24 h 后处死,采用干湿质量法测量脑含水量,尼氏染色光镜下观察海马细胞形态,ELISA 法测定脑组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 的表达水平。结果 脑损伤大鼠脑含水量明显升高,海马损伤严重,脑组织内 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的水平明显升高,IL-10 的水平明显下降;经过人参总皂苷治疗后脑含水量明显下降,海马细胞损伤减轻,TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的水平明显下降,IL-10 的水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 人参总皂苷对脑损伤后脑组织有保护作用,其机制可能与调节脑组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  的表达,从而减轻炎症反应有关。

**关键词:**脑损伤;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;白细胞介素 1 $\beta$ ;白细胞介素 6;白细胞介素 10

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.10.035

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)10-1008-03

## Effect of ginseng total saponin on the inflammatory cytokines in the brain tissue after traumatic brain injury in rats\*

Xia Lei<sup>1</sup>, Jiang Zhenglin<sup>2△</sup>, Wang Guohua<sup>2</sup>, Hu Baoying<sup>2</sup>, Gao Zhiwei<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China;

2. Voyage Medical Reserch of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of ginseng total saponin(GTS) on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 in the brain tissue after traumatic brain injury(TBI) in rats, and explore the underlying mechanisms of GTS treatment on the secondary brain injury. **Methods** Rats were randomly divided into 3 groups: sham-operated group, TBI group and GTS-treated group. TBI model was established with the modified Feeney's method. 24 h after TBI, the rats were sacrificed to measure the brain water content with wet-dry weight method. The morphological change of neuron in hippocampal area was observed under optical microscope through Nissl staining. The contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 in the brain tissue were detected with ELISA method. **Results** After brain injury, the brain water content was significantly increased, the damage of hippocampus was serious, the contents of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  were significantly elevated and IL-10 was significantly decreased. After GTS treatment, the hippocampal damage was alleviated, the brain water content was significantly decreased, the contents of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  were significantly reduced and IL-10 was significantly elevated( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Ginseng total saponin could provide neuroprotection after traumatic brain injury in rats. The mechanisms of this effect may be related to regulation by GTS of the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  in the brain tissue and resultant alleviation of cerebral inflammatory response.

**Key words:** traumatic brain injury; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; interleukin-1 $\beta$ ; interleukin-6; interleukin-10

炎症反应是颅脑损伤后继发性脑损伤病理生理改变的重要部分。虽然中枢神经系统有血脑屏障,但是损伤后出现类似外周器官的免疫激活,引起大量免疫调节物质释放。炎症反应导致了颅脑损伤后的脑水肿、脑血流紊乱、血脑屏障通透性改变、神经元死亡,同时刺激中枢神经系统的再生,其中炎症细胞因子在脑损伤后炎症反应中发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。本实验主要研究人参总皂苷治疗对脑损伤大鼠脑组织中促炎因子——肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)及抗炎因子——白介素-10(IL-10)的影响,探讨人参总皂苷治疗脑损伤的作用机制。

### 1 材料与方 法

**1.1 动物与分组** 选取健康雄性成年 SD 大鼠 54 只,体质量 250~300 g,由南通大学实验动物中心提供。随机分为假手术

组、脑损伤组、人参总皂苷治疗组,每组 18 只。

**1.2 主要试剂及仪器** 人参总皂苷(粉剂,纯度大于 95%,白求恩医科大学基础医学院有机化学教研室);大鼠 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、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);电热恒温干燥箱(101AB-3,海门市恒昌仪器厂);冰冻切片机(CM1900 型,德国 Leica 公司)等。

**1.3 脑损伤模型制作** 采用改良 Feeney 法<sup>[3]</sup>,按自由落体原理自制一打击器,由撞杆、下落打击棒和金属套管 3 部分组成。打击棒重 20 g,下落高度 30 cm,撞杆头端呈圆球型,直径 4.5 mm,末端膨大,以限制打击时撞杆的打击深度为 2.5 mm。大鼠用 10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉后,固定头部,暴露前囟,以前囟后 3.5 mm 及右侧 2.5 mm 处为中心开一直径为 5 mm

\* 基金项目:2008 年南通市社会发展科技计划基金资助项目(S2008011)。 △ 通讯作者, Tel:(0513)85051796; E-mail:jiangzl@ntu.edu.cn。

的骨窗,保持硬脑膜的完整。将打击装置垂直固定于大鼠的脑表面,打击棒沿金属套管从 30 cm 高度打击大鼠头部造成右侧大脑半球局部脑挫裂伤。充分止血后,予以碘伏清洗伤口并缝合头皮。假手术组仅开骨窗不打击。术后 3 h 给予人参总皂苷 20 mg/kg 腹部注射治疗,脑损伤组注射等量的生理盐水 2 次/d,假手术组不做任何处理。24 h 后处死大鼠。

**1.4 脑含水量测定** 每组随机取 6 只大鼠,断头取脑,测定脑组织的含水量,观察脑水肿的严重程度。取大鼠损伤侧脑组织,去除凝血,用电子天平测其湿质量,然后于 80 °C 烤箱烘烤 72 h 至恒质量,取出称干质量,用干湿法计算含水量:脑含水量 =  $\frac{\text{湿质量} - \text{干质量}}{\text{湿质量}} \times 100\%$ 。

**1.5 尼氏染色** (1)各组随机取 6 只大鼠,10%水合氯醛麻醉后开胸,经左心室向升主动脉快速灌注 37 °C 生理盐水 150 mL,继之灌注 0~4 °C 的 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液(4%PA 液)500 mL,先快后慢于 1 h 内灌注完。断头取脑,去除小脑和嗅球,4%PA 固定液中固定 6~8 h。(2)将全脑依次移入含 20%和 30%蔗糖的磷酸盐缓冲液中进行梯度固定,置于 4 °C 冰箱中至组织块沉底。(3)快速冰冻切片,取实验所需部位在 -20 °C 下冷冻连续切片,片厚 30 μm,每隔 5 片取一片,共取 3 片。(4)将脑片直接贴于涂胶的载玻片上,室温下风干。(5)依次将切片放入氯仿 30 min,丙酮 15 min,100%乙醇 30 s,95%乙醇 3 s,70%乙醇 30 s,ddH<sub>2</sub>O 30 s×2 次,焦油紫染液 20 min,ddH<sub>2</sub>O 30 s×3 次,70%乙醇 60 s,95%乙醇 60 s,100%乙醇 60 s,氯仿 5 min,分化剂 5~7 min,95%乙醇 1~2 min,100%乙醇 2~3 min,二甲苯 1~2 min。(6)用中性树胶封片,盖玻片封闭,晾干后置于显微镜(Leica DMLB 型)下对大鼠海马结构进行观察。

**1.6 炎症细胞因子含量测定** 每组随机选取 6 只大鼠,断头取脑,在损伤灶周围取脑组织 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 IL-1β、IL-6、IL-10、TNF-α 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,混匀后即测量 OD<sub>450</sub> 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** 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,统计分析采用 SPSS11.5 软件进行数据处理,多个样本均数比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间均数两两比较用 LSD 法。

**2 结 果**

**2.1 脑含水量测定** 与假手术组比较,脑损伤组脑组织含水量明显升高( $P < 0.01$ )。经人参总皂苷治疗后,脑组织含水量较脑损伤组明显降低( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 各组脑组织含水量比较

组别	动物数(只)	脑含水量( $\bar{x} \pm s, \%$ )
假手术组	6	70.14 ± 0.64
脑损伤组	6	73.51 ± 0.67*
人参总皂苷治疗组	6	72.66 ± 0.43#

\*:  $P < 0.01$ ,与假手术组比较;#:  $P < 0.05$ ,与脑损伤组比较。

**2.2 组织形态学观察** 假手术组海马 CA3 区细胞层次排列整齐,分为 4~5 层,细胞外周围组织间隙正常。细胞形态规则,细胞质内焦油紫丰富,着色均匀,周边尼氏体着蓝色,细胞核空不着色,核仁着色,清楚可见,神经细胞数(74.33 ± 8.91)个。脑损伤组海马 CA3 区神经细胞稀疏,排列紊乱,无层次感,细胞肿胀,形态不规则,部分胞质自溶,颗粒脱失,尼氏体明显减少,甚至消失,胞核体积变小,固缩深染,结构不清,神经细胞数(38.00 ± 4.76)个。人参总皂苷治疗组海马 CA3 区神经细胞约 2~3 层,层次排列稍紊乱,神经细胞体积略肿胀,形态稍规则,部分胞质自溶,颗粒脱失,着色不均匀,尼氏体减少,神经细胞数(75.50 ± 4.28)个。与脑损伤组比较,经人参总皂苷治疗后海马神经元损伤明显减轻( $P < 0.01$ )。神经细胞数比较见表 2,各组大鼠海马 CA3 区尼氏染色见封 3 图 1。

表 2 各组海马 CA3 区神经元计数比较

组别	动物数(只)	CA3 区神经元计数( $\bar{x} \pm s, \text{个}$ )
假手术组	6	74.33 ± 8.91
脑损伤组	6	38.00 ± 4.76*
人参总皂苷治疗组	6	75.50 ± 4.28#

\*:  $P < 0.01$ ,与假手术组比较;#:  $P < 0.01$ ,与脑损伤组比较。

**2.3 炎症细胞因子含量测定** 与脑损伤组比较,人参总皂苷治疗组 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平降低,而 IL-10 水平则显著升高( $P < 0.01$ ),见表 3。

表 3 人参总皂苷治疗对 TBI 大鼠炎症细胞因子水平的影响( $\bar{x} \pm s, \text{ng/g}, n = 6$ )

组别	IL-6	TNF-α	IL-1β	IL-10
假手术组	2.22 ± 0.99	0.88 ± 0.39	0.65 ± 0.28	6.31 ± 0.62
脑损伤组	9.34 ± 3.22*	11.49 ± 0.95*	2.18 ± 0.36*	4.19 ± 0.0.63*
人参总皂苷治疗组	5.73 ± 2.26▲	8.41 ± 0.90▲	1.50 ± 0.34▲	7.86 ± 0.83▲▲

\*:  $P < 0.01$ ,与假手术组比较;▲:  $P < 0.05$ ,▲▲:  $P < 0.01$ ,与脑损伤组比较。

**3 讨 论**

正常脑组织中炎症细胞因子表达极微,但是创伤性颅脑损伤后,由于机体受到创伤、缺血、缺氧等因素的攻击,脑组织产生大量的炎症细胞因子,导致脑水肿,破坏血脑屏障,加剧继发性损伤<sup>[4-5]</sup>。TNF-α、IL-1β、IL-6 被认为属于促炎细胞因子,它们在颅脑损伤后以及脑水肿的早期短暂超量表达是造成继发性颅脑损害的重要因素,故它们的表达水平可作为衡量颅脑损伤后继发性炎症反应程度的重要指标<sup>[6-8]</sup>。TNF-α 是较早释放的具有多种生物效应的重要促炎细胞因子,在炎症反应过程中可以激活细胞因子级联反应,诱导白介素和次级炎症介质的合成,神经系统中星形胶质细胞、血管内皮细胞、小胶质细胞以及神经元均可产生 TNF-α<sup>[9]</sup>。TNF-α 在脑组织中高表达时会产生神经毒性,加速神经细胞的死亡<sup>[10]</sup>。IL-1β 主要产生于星形胶质细胞和小胶质细胞,其过量表达可能通过多种途径在颅脑损伤中发挥作用,介导神经元坏死、缺失,引起继发性脑损害<sup>[11]</sup>。IL-6 能促使白细胞与内皮细胞黏附,引起内皮细胞损伤,增加血脑屏障的通透性,并产生氧自由基,引起神经细胞死亡<sup>[12]</sup>。有报道 IL-10 具有很强的抗炎作用,它可以抑制某些

炎症因子,如 IL-2、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等的合成及活性,有助于控制炎症,保持内环境的稳定<sup>[13]</sup>。因此,脑组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  的含量变化对于保持脑组织内环境的稳定至关重要。

人参是一种重要的中药,人参总皂苷是其主要活性成分之一,人参总皂苷含人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rg1 和三七皂苷 R1 等成分。人参皂苷 Rb1 为钙离子拮抗剂,三七皂苷 R1 是一种较好的粒细胞诱导剂。有研究证明,人参总皂苷具有改善微循环、抗自由基、阻止钙离子内流和抑制炎症反应等多重作用,从而可对损伤神经组织起保护作用<sup>[14-15]</sup>。

本研究发现,脑损伤后,损伤侧脑组织含水量明显升高,损伤区的皮质、海马、齿状回等区域锥体细胞明显减少,细胞排列紊乱,形态不规则,损伤灶周围脑组织中的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  表达增高,IL-10 表达降低。经过人参总皂苷治疗后,大鼠海马神经细胞损伤减轻,损伤侧脑组织含水量明显降低,IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  在损伤灶周围表达明显降低,IL-10 表达升高。提示人参总皂苷可以有效地抑制脑损伤后炎症反应,减轻脑水肿,从而可降低脑损伤后继发性损伤的程度,达到神经保护作用。但是,人参总皂苷调节脑损伤后炎症细胞因子表达水平的详细机制还有待进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, et al. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2002, 8(2): 101-103.

[2] Grossman KJ, Goss CW, Stein DG. Effects of progesterone on the inflammatory response to brain injury in the rat[J]. *Brain Res*, 2004, 1008(1): 29-31.

[3] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. *Brain Res*, 1981, 211(1): 67-69.

[4] 唐晓平,王远传,彭华. 颅脑损伤后炎症细胞的变化及其与继发性脑损伤的关系[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2007, 12(3): 406-408.

[5] 罗超,刘运生,赵贤军,等. 伤灶局部亚低温、引流治疗对创伤性脑损伤时 Na<sup>+</sup>、脑含水量及 TNF- $\alpha$  的变化[J]. *重庆医学*, 2006, 35(9): 818-820.

[6] 屈强,史忠. 严重颅脑损伤患者早期外周血 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、ACTH、皮质醇和淋巴细胞 GR 的变化[J]. *重庆医学*, 2007, 36(9): 1801-1803.

[7] 肖国民,危静. 大鼠脑损伤后核因子- $\kappa$ B 与肿瘤坏死因子- $\alpha$  的表达[J]. *浙江医学*, 2005, 27(1): 27-29.

[8] 赵美玲,徐道妙. 创伤性脑损伤与中枢炎症反应[J]. *中国现代医生*, 2009, 47(12): 27-29.

[9] 张信芳. 亚低温疗法对重型脑损伤患者 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-10 的影响[J]. *中国实用医药*, 2009, 4(27): 46-48.

[10] Oshima T, Lee S, Sato A, et al. TNF-alpha contributes to axonal sprouting and functional recovery following traumatic brain injury[J]. *Brain Res*, 2009, 1290(1): 102-104.

[11] Marini H, Altavilla D, Bellomo M, et al. Modulation of IL-1 beta gene expression by lipid peroxidation inhibition after kainic acid-induced rat brain injury[J]. *Exp Neurol*, 2004, 188(1): 178-180.

[12] Folkersma H, Breve JJ, Tilders FJ, et al. Cerebral microdialysis of interleukin (IL)-1beta and IL-6: extraction efficiency and production in the acute phase after severe traumatic brain injury in rats[J]. *Acta Neurochir*, 2008, 150(12): 1277-1279.

[13] Knobloch SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury[J]. *Exp Neurol*, 1998, 153(1): 143-145.

[14] 樊兴娟,姜正林,王国华,等. 人参总皂苷对大鼠脑缺血再灌注的神经保护研究[J]. *交通医学*, 2006, 20(6): 662-664.

[15] 樊兴娟,柯开富,姜正林,等. 人参皂苷单体对大鼠局灶性脑缺血再灌注的神经保护研究[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(29): 2071-2073.

(收稿日期:2010-09-08 修回日期:2010-10-17)

(上接第 1007 页)

[6] Liu DL, Xia SS, Wu WX, et al. Anatomy of vasculature of 850 spleen specimens and its application in partial splenectomy[J]. *Surgery*, 1996, 119(1): 27-29.

[7] 肖金成,郭晨阳,刘海泉,等. 部分脾栓塞术致肠梗阻 13 例分析[J]. *中国误诊学杂志*, 2007, 7(9): 2130-2133.

[8] 郭添胜,曹小龙,黄福喜. 3 种栓塞剂在部分性脾动脉栓塞中的临床观察[J]. *重庆医学*, 2005, 34(7): 1049-1051.

[9] 何能树,吴恩惠. *中华影像医学介入放射学卷*[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:441-450.

[10] 单鸿,罗鹏飞,李彦豪. *临床介入治疗学*[M]. 广州:广东

科技出版社,1997:215-266.

[11] 张孟增,刘沧君,路福志,等. 部分性脾动脉栓塞治疗脾功能亢进[J]. *中国介入影像与治疗学*, 2005, 2(3): 190-192.

[12] 张清明,杨建军,权辉,等. 部分脾动脉栓塞术治疗肝硬化门脉高压症 46 例[J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(24): 2280-2281.

[13] 姚红响,陈根生,诸葛英,等. 部分脾动脉栓塞术后少见并发症的分析及对策[J]. *实用放射学杂志*, 2007, 23(11): 1507-1509.

(收稿日期:2010-10-10 修回日期:2010-11-20)