

- chondrial pathway [J]. *Exp Lung Res*, 2017, 43(1):49-56
- 15 Hu J, Yan Q, Shi C, *et al.* BMSC paracrine activity attenuates interleukin-1 β -induced inflammation and apoptosis in rat AF cells via inhibiting relative NF- κ B signaling and the mitochondrial pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(1):79-89
 - 16 Lin M, Tang S, Zhang C, *et al.* Euphorbia factor L2 induces apoptosis in A549 cells through the mitochondrial pathway [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(1):59-64
 - 17 Xue Z, Song Z, Wan Y, *et al.* Calcium-sensing receptor antagonist NPS2390 attenuates neuronal apoptosis through intrinsic pathway following traumatic brain injury in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(2):589-594
 - 18 Miao Q, Ge M, Huang L. Up-regulation of GBP2 is associated with neuronal apoptosis in rat brain cortex following traumatic brain injury [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(5):1515-1523
 - 19 Gao Y, Zhuang Z, Gao S, *et al.* Tetrahydrocurcumin reduces oxidative stress-induced apoptosis via the mitochondrial apoptotic pathway by modulating autophagy in rats after traumatic brain injury [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3):887-899
 - 20 陈坤, 张明, 陈北冬, 等. 银杏内酯 B 抑制高糖诱导内皮细胞凋亡及机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(3):378-383
 - 21 Yu WH, Dong XQ, Hu YY, *et al.* Ginkgolide B reduces neuronal cell apoptosis in the traumatic rat brain: possible involvement of toll-like receptor 4 and nuclear factor kappa B pathway [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(12):1838-1844
 - 22 Hu YY, Huang M, Dong XQ, *et al.* Ginkgolide B reduces neuronal cell apoptosis in the hemorrhagic rat brain: possible involvement of Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3):1462-1468

(收稿日期:2018-03-30)

(修回日期:2018-04-09)

豁痰化瘀利水方对急性硬膜下血肿大鼠脑组织 MCP-1、NF- κ B 的影响

蔡清风 刘正敏 李 烨 胡小铭 刘补兴 童军卫

摘 要 目的 探究豁痰化瘀利水方对急性硬膜下血肿(ASDH)大鼠脑组织单核细胞趋化因子-1(MCP-1)、核因子- κ B(NF- κ B)的影响。**方法** 将成年 SD 大鼠随机分为模型组(ASDH 组)、假手术组(Shame 组)、天丹通络胶囊组(阳性对照组)及豁痰化瘀利水方组(观察组),其中观察组依据剂量可分为低剂量、中剂量、高剂量组;ASDH 造模成功后给予各组相应治疗处理,观察脑组织硬膜下血肿面积,并检测急性硬膜下脑组织中 MCP-1、NF- κ B 阳性表达情况、mRNA 表达水平及蛋白水平。**结果** 治疗处理后,与 ASDH 模型组比较,其他组血肿面积、MCP-1、NF- κ B 阳性细胞表达比例、mRNA 相对表达水平及蛋白水平均显著降低($P < 0.01$);与阳性对照组比较,中剂量、高剂量组血肿面积、MCP-1、NF- κ B 阳性细胞表达比例、mRNA 相对表达水平及蛋白水平均显著降低($P < 0.01$),而低剂量组血肿面积、MCP-1、NF- κ B 相对表达水平均显著升高($P < 0.01$);与中剂量比较,高剂量组血肿面积、MCP-1、NF- κ B 阳性细胞表达比例、mRNA 相对表达水平及蛋白水平均显著降低($P < 0.01$)。**结论** 豁痰化瘀利水方能够有效减少急性硬膜下血肿面积,降低脑组织中 MCP-1、NF- κ B 的表达,其效果与豁痰化瘀利水方剂量关系密切。

关键词 豁痰化瘀利水方 急性硬膜下血肿 大鼠脑组织 单核细胞趋化因子-1 核因子- κ B

中图分类号 R651.1 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.01.021

Influence of Removing Phlegm, Removing Stasis, Inducing Diuresis Decoction on MCP-1 and NF- κ B in Brain Tissue of Rats with Acute Subdural Hematoma. Cai Qingfeng, Liu Zhengmin, Li Ye, *et al.* Department of neurosurgery, Taizhou Hospital in Zhejiang, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To explore the influence of removing phlegm, removing stasis, inducing diuresis decoction on MCP-1 and NF- κ B in brain tissue of rats with acute subdural hematoma (ASDH). **Methods** The adult SD rats were randomly divided into the model group (ASDH group), the sham operation group (Shame group), the Tiandan Tongluo capsule group (positive control group),

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY15H130029)

作者单位:317000 浙江省台州医院神经外科(蔡清风、胡小铭);318050 台州恩泽医疗中心(集团)恩泽医院神经外科(刘正敏、李烨、刘补兴、童军卫)

通讯作者:童军卫,电子信箱:caiqingfeng1982@126.com

and the removing phlegm, removing stasis, inducing diuresis decoction group (observation group). The observation group were divided into low dose, medium dose, high dose groups according to basis dose. After ASDH model was built successfully, all the groups were given the corresponding treatment, and hematoma area size in brain subdural tissue was observed, and MCP-1 and NF- κ B positive expressions, mRNA expression and protein level in acute subdural brain tissue were detected. **Results** After treatment, compared with those in the ASDH model group, hematoma area, MCP-1, NF- κ B positive cells expression ratio, mRNA relative expression level and protein level significantly decreased in the other groups ($P < 0.01$). Compared with those in the positive control group, hematoma area, MCP-1, NF- κ B positive cells expression ratio, mRNA relative expression level and protein level significantly decreased in the medium dose, high dose groups of the observation group ($P < 0.01$), and hematoma area, MCP-1, NF- κ B relative expression level significantly increased in the low dose group ($P < 0.01$). Compared with those in the medium dose group, MCP-1, NF- κ B positive cells expression ratio, mRNA relative expression level and protein level significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Removing phlegm, removing stasis, inducing diuresis decoction can effectively reduce the area of acute subdural hematoma, reduce the expression of MCP-1 and NF- κ B in brain tissue. The effect is closely related to the dosage of removing phlegm, removing stasis, inducing diuresis decoction.

Key words Inducing diuresis decoction; Acute subdural hematoma; Rat brain tissue; Monocyte chemotactic factor -1; Nuclear factor - κ B

急性硬膜下血肿 (acute subdural hematoma, ASDH) 是由于大脑桥静脉断裂使得血液聚集于硬膜下腔而形成的一种颅脑损伤并发症, 患者临床常出现颅内高压、脑水肿而表现为失语、偏瘫、昏迷等症状, 其致残率高、病死率高, 严重威胁患者生命健康^[1]。研究发现, 颅内高压、脑水肿多由非感染性炎症反应引起, 而单核细胞趋化因子-1 (MCP-1)、核因子- κ B (NF- κ B) 在炎症发生过程中起着重要作用^[2,3]。目前, 临床多通过手术治疗 ASDH 患者, 但手术病死率居高不下^[4]。研究显示, 中医药治疗 ASDH 能有效降低炎症反应, 疗效显著^[5]。由此, 本研究通过建立成年大鼠 ASDH 模型, 以探究分析豁痰化瘀利水方对 ASDH 大鼠脑组织 MCP-1、NF- κ B 的影响, 现报道如下。

材料与方法

1. 材料与试剂: 所有健康成年 SD 大鼠由笔者医院动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (浙) 2016-0019; 豁痰化瘀利水方各中药成分均购自台州中医大药房; 天丹通络胶囊 (规格 0.4 克/粒; 批号: 20150204) 购自山东凤凰制药股份有限公司; DAB 显色试剂盒 (规格: 100ml, 批号: DA1015) 购自北京索莱宝科技有限公司; 羊抗大鼠 MCP-1 (批号: sc-130328) 及兔抗大鼠 NF- κ B 多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司; Trizol 一步法试剂盒及 RT-PCR 定量引物均购自美国 Invitrogen 公司; RNA 反转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒及相关酶类均购自日本 TaKaRa 公司; 免疫印迹 ECL 发光试剂盒 (规格: 100ml, 批号: E002050) 购自上海硕嘉生物

科技有限公司。

2. 动物处理及分组: 选取健康成年 SD 大鼠 152 只, 雌雄各半, 3 月龄, 体质量 250 ± 20 g, 按数字表法将其随机分为 4 组, 每组各 38 只; (1) 模型组: 即 ASDH 组, 钻孔注血, 以灌胃方式给予该组 2ml 蒸馏水。 (2) 假手术组: 即 Sham 组, 只钻孔不注血, 以灌胃方式给予该组 2ml 蒸馏水。 (3) 阳性对照组: 以灌胃方式给予 ASDH 大鼠 2ml 天丹通络胶囊治疗, 0.54 g/kg, 1 次/天。 (4) 观察组: 以灌胃方式该组给予 ASDH 大鼠 2ml 豁痰化瘀利水方低剂量、中剂量、高剂量治疗, 浓度分别为 14.13、28.26、56.52g/kg, 1 次/天; 以上处理均持续 14 天。

3. 药物制备: 豁痰化瘀利水方由 20g 丹参、15g 当归、15g 川芎、15g 水蛭、15g 地龙、10g 胆南星、6g 天竺黄等中药材组成, 加水 600ml, 室温浸泡 30min, 常规煎煮至 200ml, 过滤药液后并在药渣中重新加水 300ml, 常规煎煮至 200ml, 经再次过滤后弃渣保留滤液, 合并 2 次过滤药液, 将其加热浓缩, 后续分别将其浓度稀释至实验所需浓度。将天丹通络胶囊药物活性成分研磨后溶于水中。

4. ASDH 造模: 依据 Yokobori 等^[6]的造模方法, 并稍加改良以复制 ASDH 模型, 具体操作如下: 所有 SD 大鼠均给予 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 麻醉后 SD 大鼠取俯卧位并将其头部固定于脑立体定向仪上, 头部剃毛后给予常规消毒, 沿头顶部正中中线切开 1 个长约 0.5cm 的切口, 偏右侧剥离骨膜以露出矢状缝与冠状缝, 采用楔形高速钻头在矢状缝右侧 3mm 及冠状缝后侧 2mm 处开 1 个直径 0.9mm 的骨

窗孔(注意避免破坏硬膜),取自体股静脉血 500 μ l 通过骨窗孔以 50 μ l/s 的速度注入硬膜下腔隙(注意避免破坏蛛网膜),待血液凝固后拔出针头,封闭骨窗孔并缝合头皮,连续 3 天注射青霉素以防止感染,通过剥离脑组织观察注血侧血肿情况已证实 ASDH 造模成功。

5. ASDH 模型脑组织血肿观察:处理 14 天后,每组随机取 8 只大鼠腹腔注射 3.5% 水合氯醛进行麻醉,完全麻醉后切断大鼠头颅,迅速剥离脑组织观察各组血肿大小,以 ASDH 造模后第 3 天大鼠脑组织血肿面积为对照 1(即 100%),分析各组处理后急性硬膜下血肿消散情况。

6. 脑组织免疫组化分析:处理 14 天后,每组随机取 8 只大鼠腹腔注射 3.5% 水合氯醛进行麻醉,完全麻醉后切断大鼠头颅,取注血侧脑组织于液氮中冷冻 10s,之后用冰冻组织切片包埋剂(OTC)包埋脑组织,通过冰冻切片机获得 4 μ m 厚的冠状位连续切片,将脑组织切片置于 10% 甲醛溶液于 4℃ 下固定过夜,经脱蜡、脱水等处理后,可通过 DAB 显色试剂盒进行 MCP-1、NF- κ B 免疫组织化学染色。阳性细胞表达为棕黄色,在光学显微镜下每只大鼠脑切片随机选取 5 个不连续视野(放大倍数 $\times 400$),依据视野中阳性细胞表达比例表示该切片 MCP-1、NF- κ B 的表达情况。

7. 脑组织 MCP-1 及 NF- κ B mRNA 水平检测:处理 14 天后,每组随机取 8 只大鼠腹腔注射 3.5% 水合氯醛进行麻醉,完全麻醉后切断大鼠头颅,取注血侧脑组织 100mg,采用 Trizol 一步法试剂盒提取大鼠脑组织总 RNA,保证总 RNA 的浓度、纯度及完整性,通过 RNA 反转录试剂盒获取模板 cDNA,将模板稀释至 100ng/ μ l,采用 RT-PCR 试剂盒分别以 MCP-1、NF- κ B 及内参基因 β -actin 定量引物(引物序列见表 1),在 RT-PCR 仪上(厂家:Bio-Rad;型号:CFX96)进行实时荧光定量 PCR(RT-PCR),反应条件为:95℃ 预变性 30s;95℃ 变性 5s;55℃ 退火 25s;72℃ 延伸 20s,40 个循环;72℃ 延伸 5min。数据读取由实时荧光定量 PCR 仪自动完成,供试基因的扩增效率均在 85% 以上。基因 MCP-1、NF- κ B 及 β -actin 表达水平计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,详见表 1。

8. 脑组织 MCP-1 及 NF- κ B 蛋白水平检测:处理 14 天后,每组随机取 8 只大鼠腹腔注射 3.5% 水合氯醛进行麻醉,完全麻醉后切断大鼠头颅,从注血侧脑组织中提取总蛋白。将脑组织用 1 $\times$ PBS 缓冲

表 1 基因 MCP-1 及 NF- κ B 引物序列

基因		序列(5'→3')	长度(bp)
MCP-1	F	ACGCTTCTGGGCTGTGTT	400
	R	AAGTGCTTGAGGTGTTGTGGA	
NF- κ B	F	TCAATG GACCAACTGAACCC	500
	R	TCCGCAATGGAGGAGAAG	
β -actin	F	TACAACCTCCTTGCAGCTCC	620
	R	GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC	

液漂洗 2 次,之后置于含 1mmol/L PMSF 的 RIPA 细胞裂解液中进行匀浆,经低温离心机以 12000r/min 转速离心 10min 后分离上清液,加入 2 $\times$ PBS 上样缓冲液,经沸水浴变性 10min,通过 10% 的 SD-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,将分离蛋白转移至 PVDF 膜,经 5% 脱脂奶粉于 4℃ 下封闭 1h,并用一抗兔抗大鼠 MCP-1、NF- κ B 及 β -Actin 多克隆抗体以 1:500 比例于 4℃ 下孵育过夜,之后再将 HPP 结合的二抗以 1:5000 比例与膜于室温下孵育 1h,通过免疫印迹 ECL 发光试剂盒检测大鼠脑组织 MCP-1、NF- κ B 蛋白表达水平。

9. 统计学方法:本研究数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,组间比较行 t 检验;计数资料用百分比(%)表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 急性硬膜下血肿消散情况比较:与 ASDH 模型组比较,其余各组血肿面积均显著降低,详见表 2。低剂量组大鼠脑组织血肿消散改善情况低于阳性对照组($P < 0.01$),中、高剂量组均高于阳性对照组($P < 0.01$),且高剂量组显著高于中剂量组($P < 0.01$)。对各脑组织组血肿面积定量分析发现,与 ASDH 模型组比较,各组血肿面积均显著降低($P < 0.01$),详见图 1、图 2;低剂量组明显高于阳性对照组

表 2 不同组急性硬膜下血肿面积比较

组别	<i>n</i>	血肿面积(%)
ASDH 模型组	8	100.00 $\pm$ 5.46
Sham 组	8	0.00 $\pm$ 0.00
阳性对照组	8	18.64 $\pm$ 1.27 *
低剂量组	8	30.59 $\pm$ 1.89 * #
中剂量组	8	11.45 $\pm$ 1.04 * # Δ
高剂量组	8	3.25 $\pm$ 0.56 * # Δ $\blacktriangle$

与 ASDH 模型组比较, * $P < 0.01$;与阳性对照组比较, # $P < 0.01$;与低剂量组比较, Δ $P < 0.01$;与中剂量组比较, $\blacktriangle$ $P < 0.01$

($P < 0.01$), 中、高剂量组血肿面积显著低于阳性对照组 ($P < 0.01$), 且高剂量组低于中剂量组 ($P < 0.01$), 详见图 3。

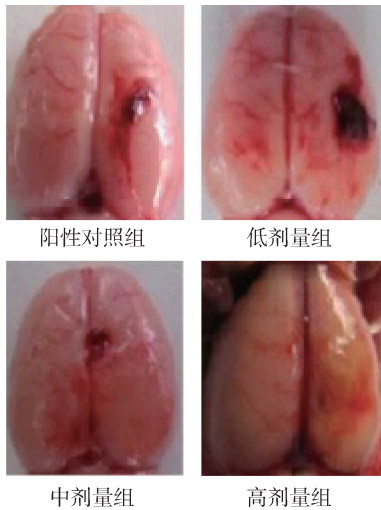


图 1 不同组急性硬膜下血肿消散情况

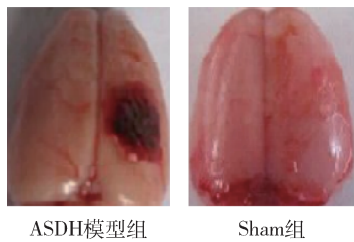


图 2 不同组血肿消散情况

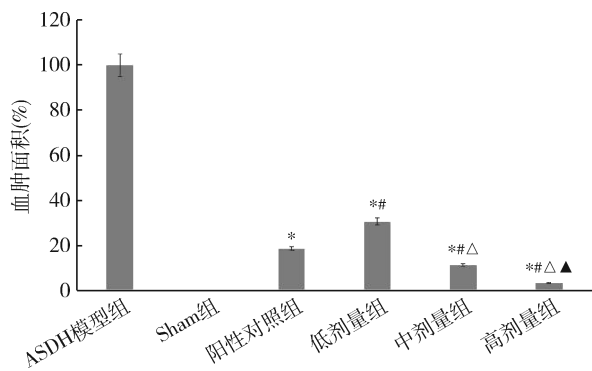


图 3 不同组血肿面积比较

与 ASDH 模型组比较, * $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, # $P < 0.01$;
与低剂量组比较, $\Delta P < 0.01$; 与中剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

2. 免疫组化分析: 各组中均观察到脑组织细胞质中 MCP-1、NF- κ B 蛋白阳性表达, Sham 组 MCP-1、NF- κ B 蛋白有弱阳性表达, 而 ASDH 模型组 MCP-1、NF- κ B 蛋白强阳性表达, 详见表 3、图 4 及图 6。与 ASDH 模型组比较, 其他组阳性细胞表达均显著降低

($P < 0.01$); 与阳性对照组比较, 观察组中剂量、高剂量组阳性细胞表达显著降低 ($P < 0.01$), 而低剂量组阳性细胞表达显著升高 ($P < 0.01$); 与中剂量比较, 高剂量组阳性细胞表达显著降低 ($P < 0.01$), 详见表 3、图 5 及图 7。

表 3 不同组阳性细胞表达情况比较

组别	n	阳性细胞表达比例 (%)	
		MCP-1	NF- κ B
ASDH 模型组	8	86.35 $\pm$ 3.28	79.21 $\pm$ 2.93
Sham 组	8	8.76 $\pm$ 0.59 *	10.25 $\pm$ 0.64 *
阳性对照组	8	23.68 $\pm$ 1.67 * #	25.45 $\pm$ 1.72 * #
低剂量组	8	35.49 $\pm$ 1.25 * # Δ	32.67 $\pm$ 1.13 * # Δ
中剂量组	8	16.72 $\pm$ 1.25 * # Δ $\blacktriangle$	14.29 $\pm$ 1.17 * # Δ $\blacktriangle$
高剂量组	8	4.25 $\pm$ 0.22 * # Δ $\blacktriangle$ $\&$	7.94 $\pm$ 0.45 * # Δ $\blacktriangle$ $\&$

与 ASDH 模型组比较, * $P < 0.01$; 与 Sham 组比较, # $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.01$; 与中剂量组比较, $\& P < 0.01$

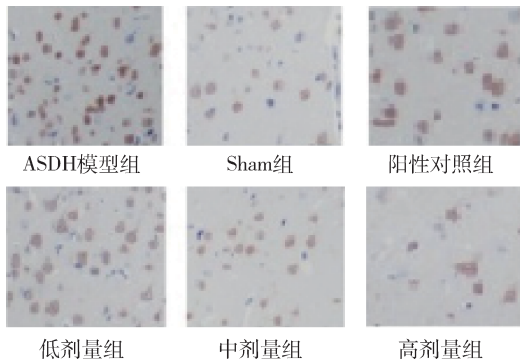


图 4 MCP-1 蛋白表达染色情况

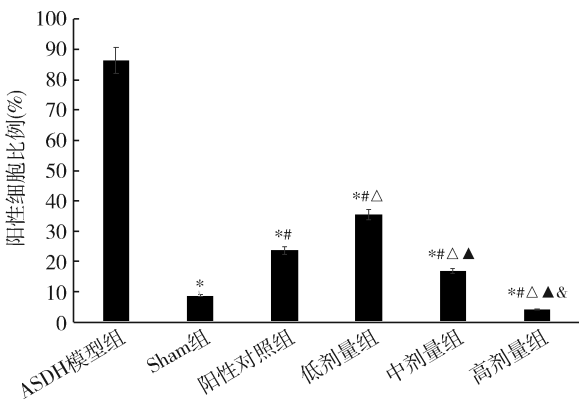


图 5 MCP-1 阳性细胞表达比例

与 ASDH 模型组比较, * $P < 0.01$; 与 Sham 组比较, # $P < 0.01$;
与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与低剂量组比较,
 $\blacktriangle P < 0.01$; 与中剂量组比较, $\& P < 0.01$

3. MCP-1 及 NF- κ B mRNA 水平: 各组总 RNA

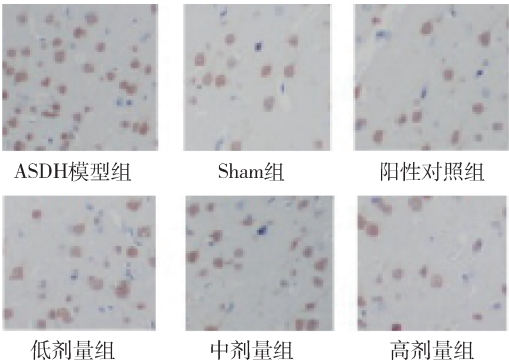


图 6 NF-κB 蛋白表达染色情况

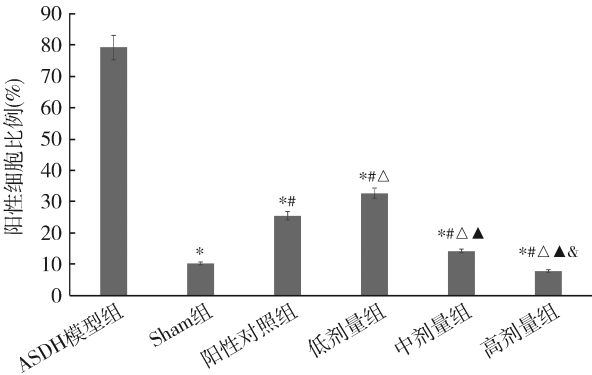


图 7 NF-κB 阳性细胞表达比例

与 ASDH 模型组比较, * $P < 0.01$; 与 Sham 组比较, # $P < 0.01$;
与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与低剂量组比较,
 $\blacktriangle P < 0.01$; 与中剂量组比较, $\& P < 0.01$

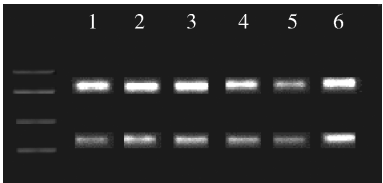


图 8 各组总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

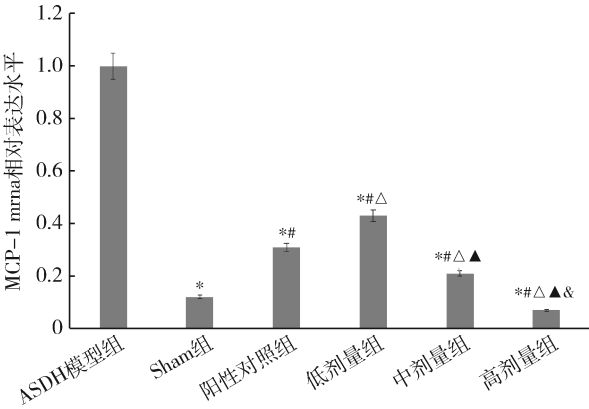


图 9 MCP-1 mRNA 相对表达水平, 以 ASDH 模型表达水平为对照

与 ASDH 模型组比较, * $P < 0.01$; 与 Sham 组比较, # $P < 0.01$;
与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与低剂量组比较,
 $\blacktriangle P < 0.01$; 与中剂量组比较, $\& P < 0.01$

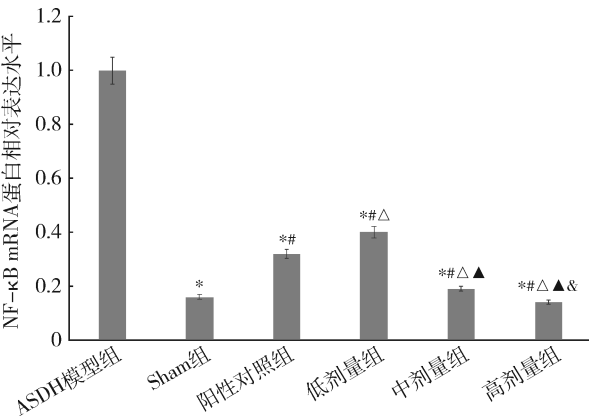


图 10 NF-κB mRNA 相对表达水平, 以 ASDH 模型表达水平为对照

与 ASDH 模型组比较, * $P < 0.01$; 与 Sham 组比较, # $P < 0.01$;
与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与低剂量组比较,
 $\blacktriangle P < 0.01$; 与中剂量组比较, $\& P < 0.01$

提取琼脂糖凝胶电泳图, 详见图 8; 与 ASDH 模型组比较, 其他组 MCP-1、NF-κB mRNA 相对表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 与阳性对照组比较, 中剂量、高剂量组 MCP-1、NF-κB mRNA 相对表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 低剂量组水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与中剂量比较, 高剂量组 MCP-1、NF-κB mRNA 相对表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 详见表 4、图 9 及图 10。

表 4 不同组 MCP-1、NF-κB mRNA 相对表达水平

组别	n	mRNA 相对表达水平	
		MCP-1	NF-κB
ASDH 模型组	8	1.00 ± 0.028	1.00 ± 0.026
Sham 组	8	0.12 ± 0.005 *	0.16 ± 0.004 *
阳性对照组	8	0.31 ± 0.014 * #	0.32 ± 0.016 * #
低剂量组	8	0.43 ± 0.026 * # Δ	0.40 ± 0.023 * # Δ
中剂量组	8	0.21 ± 0.018 * # Δ $\blacktriangle$	0.19 ± 0.015 * # Δ $\blacktriangle$
高剂量组	8	0.07 ± 0.004 * # Δ $\blacktriangle$ $\&$	0.14 ± 0.009 * # Δ $\blacktriangle$ $\&$

与 ASDH 模型组比较, * $P < 0.01$; 与 Sham 组比较, # $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.01$; 与中剂量组比较, $\& P < 0.01$

4. MCP-1 及 NF-κB 蛋白水平: 各组蛋白电泳图见图 11。与 ASDH 模型组比较, 其他组 MCP-1、NF-κB mRNA 相对表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 与阳性对照组比较, 中、高剂量组 MCP-1、NF-κB 蛋白相对表达水平均显著降低 ($P < 0.01$),

而低剂量组均显著升高 ($P < 0.01$) ; 与中剂量比较, 高剂量组 MCP - 1、NF - κ B mRNA 相对表达水平均显著降低 ($P < 0.01$) , 详见表 5、图 12 及 13。

表 5 不同组 MCP - 1、NF - κ B 蛋白相对表达水平

组别	n	蛋白相对表达水平	
		MCP - 1	NF - κ B
ASDH 模型组	8	2.38 $\pm$ 0.15	2.16 $\pm$ 0.17
Sham 组	8	0.34 $\pm$ 0.04 *	0.42 $\pm$ 0.07 *
阳性对照组	8	1.36 $\pm$ 0.10 *#	1.28 $\pm$ 0.08 *#
低剂量组	8	1.88 $\pm$ 0.12 *# Δ	1.74 $\pm$ 0.10 *# Δ
中剂量组	8	0.92 $\pm$ 0.08 *# Δ $\blacktriangle$	0.83 $\pm$ 0.06 *# Δ $\blacktriangle$
高剂量组	8	0.57 $\pm$ 0.05 *# Δ $\blacktriangle$ $\&$	0.61 $\pm$ 0.04 *# Δ $\blacktriangle$ $\&$

与 ASDH 模型组比较, * $P < 0.01$; 与 Sham 组比较, # $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, Δ $P < 0.01$; 与低剂量组比较, $\blacktriangle$ $P < 0.01$; 与中剂量组比较, $\&$ $P < 0.01$

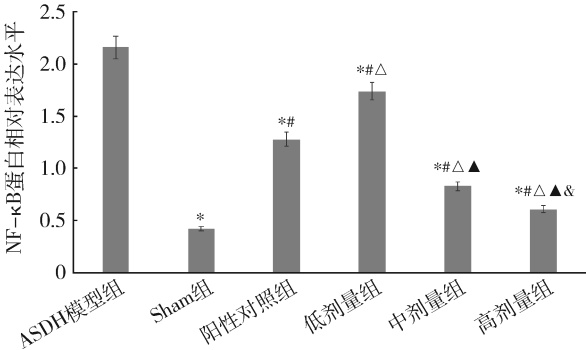


图 13 NF - κ B 蛋白相对表达水平, 以 β - actin 内参蛋白为对照

与 ASDH 模型组比较, * $P < 0.01$; 与 Sham 组比较, # $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, Δ $P < 0.01$; 与低剂量组比较, $\blacktriangle$ $P < 0.01$; 与中剂量组比较, $\&$ $P < 0.01$

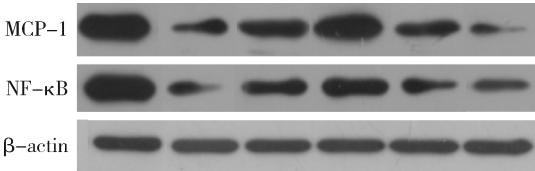


图 11 MCP - 1、NF - κ B 蛋白免疫印迹电泳条带

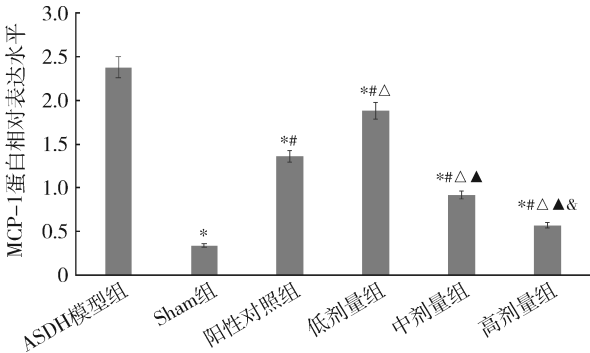


图 12 MCP - 1 蛋白相对表达水平, 以 β - actin 内参蛋白为对照

与 ASDH 模型组比较, * $P < 0.01$; 与 Sham 组比较, # $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, Δ $P < 0.01$; 与低剂量组比较, $\blacktriangle$ $P < 0.01$; 与中剂量组比较, $\&$ $P < 0.01$

讨 论

本研究基于 Yokobori 等^[6]的造模方法并加以改良后获得了稳定、高效的大鼠急性硬膜下血肿模型 (ASDH), 通过剥离脑组织观察注血侧血肿情况已证实 ASDH 造模成功。为确定正常情况及治疗处理后血肿消散情况, 本研究分析统计各组血肿面积, 结果表明正常情况下 ASDH 模型 14 天后存在部分血肿自然消散情况, 而其他组血肿面积均显著低于 ASDH 模

型组; 处理后观察组中剂量及高剂量组血肿面积均显著低于阳性对照组, 而观察组低剂量组血肿面积显著高于阳性对照组, 提示豁痰化瘀利水方具有促进血脑屏障恢复, 减轻脑水肿的作用, 且与剂量有关, 剂量越高其效果越显著。

有关研究表明, 急性硬膜下血肿发生后, 其血肿周围组织可刺激诱导多种炎性细胞因子聚集, 并引发机体炎性反应, 进而加剧脑损伤^[7,8]。MCP - 1 属于 CC 趋化因子家族, 是一种促炎细胞因子, 可在神经元细胞、神经胶质细胞等的神经组织中表达, 脑血肿损伤能够特异性激活并趋化单核 - 吞噬细胞参与炎性反应, 而活化的神经胶质细胞可产生大量神经毒性因子, 在脑损伤、神经炎症等多种疾病中具有重要作用^[9,10]; MCP - 1 可通过单核 - 吞噬细胞浸润诱导释放炎性细胞因子及在脑损伤区域聚集白细胞而加剧血肿炎性反应^[11]。研究显示, ASDH 等疾病发生时 MCP - 1 水平呈高表达, 病情好转时, MCP - 1 水平显著降低^[12]。本研究结果表明, 与 ASDH 模型组比较, 其他组血肿面积、MCP - 1 阳性细胞表达比例、mRNA 相对表达水平及蛋白水平均显著降低, 且效果与豁痰化瘀利水方剂量呈依赖关系, 认为豁痰化瘀利水方更能有效减少硬膜下血肿面积, 豁痰化瘀利水方可能通过抑制 MCP - 1 表达, 抑制炎性通路活化, 减轻炎性反应, 减轻脑水肿, 并促进血肿的消散。此结果与有关研究一致, 进一步表明豁痰化瘀利水方对改善 ASDH 具有一定的作用。

NF - κ B 是一种核转录调控因子, 经刺激活化后能够调控多种细胞因子、趋化因子等蛋白合成, 并促使释放大量炎性细胞因子, 参与 ASDH 引起的炎性反

应网络,产生的炎性瀑布反应可进一步引起继发性脑损伤^[13];NF- κ B在脑损伤中同时具有双重作用,可促进炎症反应引起神经损伤,同时对神经系统起到保护作用^[14]。还有研究认为,NF- κ B是调节脑损伤后炎性反应的重要靶点,其不仅可介导多种炎性因子的表达,也是调节脑损伤后炎性反应的重要信号调控因子^[15,16]。有关研究认为,化痰涤痰汤对急性硬膜下血肿大鼠脑组织NF- κ B介导的炎性反应具有调节作用,且对ASDH大鼠也有明显的治疗作用^[16]。

本研究结果显示,不同组NF- κ B mRNA及蛋白水平比较差异有统计学意义,随着豁痰化痰利水方剂量升高,NF- κ B mRNA及蛋白水平呈现下降的趋势,且效果与剂量呈依赖关系,表明NF- κ B与ASDH的发生密切相关,而豁痰化痰利水方能够通过降低NF- κ B的表达而达到改善ASDH,推测其作用可能是通过调节NF- κ B的平衡而实现的。可能是本方剂中含有丹参、当归、水蛭等药物,丹参能够抑制NF- κ B的表达与活性,使多种炎性因子基因转录减少,减少炎性递质释放,缓解炎性因子损伤及氧化应激反应;而当归具有增强免疫力、抗炎、清除自由基、抗血栓形成及改善血液循环等作用,当归能够降低氧化自由基对NF- κ B的活化引起的炎性反应,诸药合用对ASDH发挥较好的改善作用。

综上所述,豁痰化痰利水方能够有效减少急性硬膜下血肿面积,降低脑组织中MCP-1、NF- κ B的表达,其效果与豁痰化痰利水方剂量关系密切,值得后期进一步扩大样本量、增加脑损伤指标等进行深入研究,以期急性硬膜下血肿患者的治疗提供一定参考依据。

参考文献

- Kim BJ, Park KJ, Park DH, *et al.* Risk factors of delayed surgical evacuation for initially nonoperative acute subdural hematomas following mild head injury[J]. *Acta Neurochirurg*, 2014, 156(12):1605-1613
- 张谷月, 房辉, 张翠林, 等. GK大鼠脑组织中MCP-1的表达与认知功能的关系[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(6):

1300-1305

- 杨莎莎, 田清友, 周洪霞, 等. TLR4和NF- κ B在脑出血大鼠炎症损伤中的表达及意义[J]. *重庆医学*, 2014, 43(5):584-586
- 陈子才, 梁勇基. 急性硬膜下血肿60例临床分析[J]. *广西医学*, 2001, 23(1):160-161
- 陆松侠, 龙子江, 干磊, 等. 化痰涤痰汤对急性硬膜下血肿模型大鼠血清的影响[J]. *中成药*, 2015, 37(1):1-5
- Yokobori S, Gajavelli S, Mondello S, *et al.* Neuroprotective effect of preoperatively induced mild hypothermia as determined by biomarkers and histopathological estimation in a rat subdural hematoma decompression model[J]. *J Neurosurg*, 2013, 118(2):370-380
- 潘新发, 万曙, 詹仁雅. 脑出血后血肿周围组织炎症反应的研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(3):263-267
- 毛志敏, 周如丹, 赵学凌, 等. MCP-1在炎症反应中的研究进展[J]. *医学综述*, 2013, 19(6):964-966
- 孙旭文, 于国平. NF- κ Bp65和MCP-1在脑缺血再灌注后脑组织局部炎症反应中的作用[J]. *中华神经科杂志*, 2004, 37(6):547-548
- Risteski M, Bye N, Ng SY, *et al.* The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in neurogenesis after traumatic brain injury (TBI)[J]. *Injury*, 2010, 41(1):S59
- 黄志华. 益生菌对急性肝内胆胆汁淤积大鼠肝组织NF- κ B和MCP-1的影响[J]. *中国微生态学杂志*, 2008, 20(1):20-22
- Stanisic M, Lyngstadaas SP, Pripp AH, *et al.* Chemokines as markers of local inflammation and angiogenesis in patients with chronic subdural hematoma: a prospective study[J]. *Acta Neurochirurg*, 2012, 154(1):113-120
- 耿明英, 程远. NF- κ B在脑损伤后脑损害和脑保护中的双重作用[J]. *创伤外科杂志*, 2005, 7(1):70-72
- Huang L, Chen B, Zhou W, *et al.* TNF- α and NF- κ B changes in brain tissue and their significance in secondary brain injury of rats[J]. *Med J Wuhan Univ*, 2017, 38(1):15-19
- 叶欣, 万曙, 詹仁雅. NF- κ B信号通路和脑出血后的继发性脑损伤[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(2):171-175
- 肖洪玲, 陆松侠, 龙子江, 等. 化痰涤痰汤对急性硬膜下血肿大鼠脑组织NF- κ B介导的炎症反应的影响[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(2):169-173

(收稿日期:2017-08-21)

(修回日期:2018-05-18)

关于审稿专家及作者提供银行卡号的启事

由于本单位财务规定,今后发放审稿费和稿费要通过银行转帐,希望审稿专家和作者及时登陆医学研究杂志网页(www.yxyjzz.cn),通过专家审稿或者作者投稿版块登录,于个人信息设置中进入修改个人信息版块,填写银行卡号、开户支行名称及卡主姓名(最好提供建设银行储蓄卡。如果是其他银行的储蓄卡还要提供支行名称和行号),以便及时为您发放审稿费和稿费,或者将上述信息发到本杂志邮箱 yxyjzz@imicams.ac.cn,如未进行银行卡号登记则无法发放审稿费。联系电话:010-52328694(李老师)

《医学研究杂志》编辑部