

● 论著 ●

补阳还五汤对沙土鼠脑缺血再灌注损伤后血清炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响

韩绍娟 刘志龙

(华南理工大学医院 广东广州 510340)

摘要 :目的 :探讨补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤后炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白表达的影响。方法 :采用 Kirino 蒙古沙土鼠双侧颈总动脉夹闭脑缺血模型 ,缺血 15min 后进行再灌注 ;于再灌注 48h 后 ,测定血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量。结果 :补阳还五汤组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 均含量明显低于模型组 ($P < 0.01$) 和标准对照组 ($P < 0.01$) ,但补阳还五汤组和标准对照组均显著高于假手术组 ($P < 0.01$)。结论 :补阳还五汤可拮抗脑缺血再灌注损伤后的炎性细胞因子 ,因而减轻脑缺血再灌注引起的损伤。

关键词 :脑缺血再灌注损伤 ;炎性细胞因子 ;补阳还五汤注射液 ;实验研究

Objective: To investigate the effects of Bu Yang Huan Wu Decoction (BYHWD) on inflammatory cellular factors. **Methods**: Cerebral ischemic reperfusion model in gerbils was used. Bilateral carotid arteries were ligated for 15 minutes, then reperfused for 48 hours. The contents of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in blood serums were detected and compared in different groups. **Result**: In comparison with ischemia-reperfusion (IR) and standardized-comparison (SC) group, IL-1 β , IL-6 and TNF- α were significantly decreased in BYHWD group (all $P < 0.01$). Compared with sham-operation (SO) group, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in BYHWD and SC group were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion**: BYHWD has a protective effect on nervous injury in cerebral ischemia and reperfusion by reduction of inflammatory cellular factors.

关键词 :cerebral ischemia; pathophysiology; Bu Yang Huan Wu Decoction; inflammatory cellular factors

中图分类号 :R 743

文献标识码 :B

文献编号 :1671-4040(2004)04-0001-03

补阳还五汤是治疗缺血性中风之名方,它首载于清代著名医家王清任的代表作《医林改错》。该方由黄芪、当归、地龙、川芎、红花、桃仁、赤芍组成,具有补气、活血、通络的功效。其用药及配伍极具匠心,临床上用于治疗“气虚血瘀”之中风。关于补阳还五汤治疗缺血性脑血管疾病作用机理的研究近年来有大量报道,而从炎性细胞因子角度研究该方的抗脑缺血损伤作用机理,尚属空白。

1 材料与方法

1.1 实验药物 补阳还五汤注射剂:补阳还五汤处方由黄芪 60g、当归 9g、地龙 9g、红花 9g、赤芍 9g、川芎 6g、桃仁 9g 组成。以上各药由暨南大学医学院第三附属医院珠海市人民医院制剂室按水煎醇沉法制备成注射剂。其工艺为:原方煎煮取药液,乙醇沉淀,再分别以酸、碱沉淀并活性炭吸附即得。生药含量为 2g/mL,灭菌冷藏备用,澄明度检查、溶血试验均合格。用时以注射用水稀释成所需浓度 0.2g/mL。

尼莫地平(注射剂,德国 Bayer 药厂提供)。

1.2 蒙古沙土鼠脑缺血再灌注实验 体重 60g~90g 蒙古沙土鼠,雌雄各半,清洁级,由卫生部广州医学院实验动物中心提供。采用 Kirino 沙土鼠双侧颈总动脉阻断模型^[1]。沙鼠随机分为假手术对照组(以下简称假手术组)、模型对照组(以下简称模型组)、补阳还五汤组(在脑缺血并再灌注时,同时腹腔注射 ip 处方提取液)、标准对照组(在脑缺血并再灌注时,同时腹腔注射 ip 尼莫地平)。在实验前 12h 及缺血前 30min 分别给药 1 次,ip 补阳还五汤稀释液 0.2g/100g

(1mL/100g),标准对照组 ip 尼莫地平 0.1mg/100g,模型组及假手术组术前术后仅给予等量生理盐水。第 2 次给药后 30 min,ip 10%水合氯醛(35mg/100g)麻醉,仰卧固定,沿颈前正中切开皮肤,分离暴露出双侧颈总动脉,除假手术组外,各组均以无创性微动脉夹夹闭双侧颈总动脉造成脑缺血,确信结扎远端无血流,呈苍白色,观察瞳孔变化及翻正反射情况。若瞳孔散大,翻正反射消失,说明产生前脑缺血。缺血 15min 后松开小动脉夹进行再灌注,缝合颈部切口,造成脑缺血再灌注模型。假手术组仅分离双侧颈总动脉。保温至动物清醒后,归笼饲养,自由摄食和取水。分别于缺血后 12h、24h、36h 各给药 1 次(缺血前和缺血后共给药 5 次或生理盐水 5 次)。于再灌注 48h 后,在麻醉下,摘除眼球取血,分离得血清,于 -20℃保存待测。测试前将标本置室温复融,混匀后 4℃、3 000rpm 离心 5min,取上清液供测试用。

1.3 观察指标 以放射免疫分析法检测各组沙土鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量。

1.4 统计学分析 以上实验数据均以均数依标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用计算机 SPSS 8.0 统计软件包中 ONEWAY ANOVA 作统计学处理。观察值为具体数值,采用 Bartlett-Box 法(作方差齐性分析),以 $P < 0.05$ 判断差异显著性。应用组间 t 检验完成各组均数的两两比较,以 $P < 0.05$ 判断差异显著性。

2 结果

2.1 各组 IL-1 β 的比较 标准对照组的 IL-1 β 含量明显

低于模型组 ($P < 0.01$), 补阳还五汤组的 IL-1 β 含量明显低于模型组 ($P < 0.01$) 和标准对照组 ($P < 0.01$), 但补阳还五汤组和标准对照组均显著高于假手术组 ($P < 0.01$)。

2.2 各组 IL-6 的比较 标准对照组的 IL-6 含量明显低于模型组 ($P < 0.01$), 补阳还五汤组的 IL-6 含量明显低于模型组 ($P < 0.01$) 和标准对照组 ($P < 0.01$), 但补阳还五汤组和标准对照组均显著高于假手术组 ($P < 0.01$)。

2.3 各组 TNF- α 的比较 标准对照组的 TNF- α 含量明显低于模型组 ($P < 0.01$), 补阳还五汤组的 TNF- α 含量明显低于模型组 ($P < 0.01$) 和标准对照组 ($P < 0.01$), 但补阳还五汤组和标准对照组均高于假手术组 ($P < 0.01$), 差异有显著性, 详见表 1。

表 1 各组血清炎症性细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-6 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术组	0.061 \pm 0.006	0.072 \pm 0.004	0.396 \pm 0.026
模型组	0.196 \pm 0.016*	0.132 \pm 0.006*	1.602 \pm 0.064*
补阳还五汤组	0.105 \pm 0.009**	0.091 \pm 0.009**	0.809 \pm 0.040**
标准对照组	0.154 \pm 0.012**	0.118 \pm 0.005**	1.233 \pm 0.085**

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

3 讨论

近年来, 越来越多的研究结果表明, 脑缺血区常伴有各种炎症介质生成, 脑微血管内皮功能障碍, 白细胞粘附活化, 并出现以白细胞浸润、脑水肿形成为标志的急性炎症的发生。大量白细胞进入脑实质后, 又可通过产生活性氧自由基、细胞因子、脂质代谢产物(AA, IIs)等化学损伤介质, 加重脑损伤。在脑缺血再灌注时, 脑实质及血管周围的小胶质细胞中多种细胞因子的 mRNA 上调且大量合成, 这与脑缺血后炎症有极其密切的关系。研究表明, 众多细胞因子以其强大的致炎作用, 参与脑缺血后炎症过程, 刺激其它细胞因子及炎症介质的产生, 并诱导损伤区白细胞浸润, 影响神经胶质细胞基因表达。这些细胞因子还可作为内皮细胞活化的信号, 刺激白细胞-内皮细胞粘附。同时, 细胞因子还可刺激组织纤溶酶原激活物抑制物、组织因子、血小板活化因子的产生, 并抑制组织纤溶酶原激活物和蛋白 S 的活性, 从而促进血栓的形成。它们在脑缺血损伤的病理过程中的作用主要表现在以下方面:

3.1 白细胞介素 1 (IL-1) IL-1 是最早被认为神经肽的细胞因子之一, 主要由单个核细胞 (包括淋巴细胞和单核-巨噬细胞) 产生的细胞因子, 作用于淋巴细胞、巨噬细胞和其它细胞, 在细胞的激活、增殖和分化中起作用。IL-1 可分为 IL-1 α 、IL-1 β 两种, 它们来源于同一染色体的不同基因编码区, 虽然仅有 26% 的相似性, 但可以相同的受体结合, 并具有几乎相同的作用。IL-1 β 是血浆和组织液中的主要分泌形式, 也是脑组织中的主要形式。中枢神经系统内的各种细胞, 包括内皮细胞、小胶质细胞、星形细胞和神经元可以合成 IL-1 β 。研究表明, 各种脑缺血模型缺血区均出现 IL-1 β mRNA 表达增高。IL-1 作用于血管内皮细胞, 引起内皮细胞形态和细胞骨架结构的变化, 使其功能受损, 还可引起组织因子样凝固活性增高。破坏凝血、抗凝机制, 易于形成血栓。其次, IL-1 β 能促进 IL-2、IL-6、IL-8 和 MC10 等细胞因

子的合成, 后者可协同 IL-1 β 的促炎作用。IL-1 β 促炎作用的另一重要环节即激活活内的小胶质细胞, 激活的小胶质细胞可通过释放细胞因子、自由基等多种机制参与脑内的炎症反应^[2]。IL-1 β 可以通过刺激内皮细胞表达白细胞粘附分子, 使白细胞聚集在缺血脑组织, 加重脑缺血损伤。清除循环中的中性粒细胞, 可以减小局灶性脑缺血的梗死面积。其次, IL-1 β 能促进 IL-2、IL-6、IL-8 和 MC10 等细胞因子的合成, 后者可协同 IL-1 β 的促炎作用。黄旭升等^[3]采用线栓法使右侧 MCA 永久堵塞制成大鼠局灶性脑缺血模型, 用免疫组化方法, 显示 IL-1 β 在脑内的表达, 结果正常组和假手术组大鼠脑内以及缺血后的非缺血半球未发现有 IL-1 β 免疫反应阳性细胞; 脑缺血 3h 后, 在缺血区有散在的 IL-1 β 阳性细胞, 呈未活化的星形胶质细胞形态, 随缺血时间延长阳性星形胶质细胞增多, 且活化程度越高, 到 2 个月时, 坏死灶周围仍有许多 IL-1 β 阳性、明显活化的星形胶质细胞。因此他们认为, 脑缺血后 3h~2 个月, 脑内有内源性的蛋白水平的 IL-1 β 产生, 来源为星形胶质细胞。IL-1 β 可能与星形胶质细胞增生及疤痕形成有密切的关系。IL-1 β 可能是通过下述机制发挥损伤作用的: (1) 激活磷脂酶 A₂。(2) 参与白细胞和小胶质细胞的激活。(3) 使内皮细胞由正常的抗凝状态转变为促凝状态, 促进内皮细胞与白细胞的粘附。(4) 促进 IL-8、TNF- α 、克隆刺激因子和 IL-1 β 自身的合成。(5) IL-1 β 是一种内源性致热源, 升高能明显加重脑缺血再灌注损伤的程度。

3.2 白细胞介素 6 (IL-6) IL-6 是一种糖蛋白, 是一种分子量为 26KD 的多肽。脑缺血再灌注后, T 细胞 (主要是 TH₂)、B 细胞、单核/巨噬细胞、内皮细胞、小胶质细胞和星形胶质细胞分泌 IL-6。IL-6 可以调节神经内分泌网络, 可抑制血管活性肠肽和促甲状腺激素释放素, 刺激垂体释放催乳素, 但不影响腺苷酸环化酶的活性和磷酸肌醇的产生以及细胞内钙的浓度; 对下丘脑-垂体-肾上腺轴也有正负调节效应^[4]。IL-6 在介导急性炎症免疫反应方面有重要的调节作用, 临床研究提示血清及脑脊液的 IL-6 水平与脑卒中后功能康复及脑梗死体积相关, 对局灶性脑缺血及心肌缺血再灌注模型的研究显示 IL-6mRNA 的表达上调。

3.3 肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) TNF 是具有广泛生物学功能的多效细胞因子。不但在抗肿瘤、抗细菌、抗病毒等方面起着复杂的作用, 而且与免疫反应也有密切关系, 参与自身免疫疾病的发生。TNF 的生物活性表达主要是通过以下三方面的作用来完成的: (1) 对血管内皮细胞作用后影响血管通透性。(2) 影响粘附因子 (ICAM-1) 的生成和表达。(3) 对血管炎性反应过程的调节和促进生长作用。Liu 等于 1994 年的研究结果显示大脑中支脉阻塞后 (MCAO) 1h 即有 TNF- α mRNA 的表达, 3h 后缺血皮层中 TNF- α mRNA 表达上升, 12h 达高峰。阻塞 5d 后缺血皮层中 TNF- α mRNA 表达水平仍有明显的提高。另外, 在短暂缺血时高血压鼠皮层 TNF- α mRNA 表达的表达式高于正常血压鼠的表达式。上述结果首次证明在局部脑缺血造成的缺血性神经元中有 TNF- α mRNA 及蛋白的表达, 炎症细胞浸润后出现的蛋白表达可进一步促进缺血性脑组织的损伤, 可能增加局

40 例肝硬化难治性腹水应用腹水浓缩超滤回输治疗分析

侯伟

(浙江省台州市立医院感染科 台州 318000)

摘要 目的:寻找治疗难治性腹水有效的治疗措施。方法:应用北京伟力新世纪科技发展有限公司制造的伟力电脑腹水超滤浓缩回输系统治疗仪治疗。结果:40 例难治性腹水患者经治疗后,每次滤出液 2600~14500mL,治疗后症状明显改善,尿量增加,肾功能检测明显改善。结论:腹水超滤浓缩是一种临床治疗难治性腹水有效的治疗措施之一。

关键词 难治性腹水;肝硬化;腹水超滤浓缩回输系统治疗仪

Objective: To find a more effective treatment of intractable ascites. **Methods:** 40 patients with intractable ascites were treated by the machine, ultrafiltration of ascites an peritoneal refusion (A-P) WLFHY-500, made by Beijing Weili new century science & tech Dev. Co.LTD. **Results:** In a total population of 40, the filtrate in each time was 2600~14500mL. The urine was increased, the symptom and nephritic fuction were obviously improved after the treatment. **Conclusion:** (A-P) is one of the most effective treatment of intractable in clinical therapeutican.

关键词 intractable ascites; cirrhosis; ultrafiltration of ascites an peritoneal refusion

中图分类号: R575.2

文献标识码: B

文献编号: 1671-4040(2004)04-0003-02

难治性腹水是肝硬化终末期的表现之一。患者的有效循环血量不足,肾排钠利尿障碍,内分泌紊乱,片面强调限钠利

尿往往不能奏效,还可能导致稀释性低钠、低血压、肝肾综合征等。早在 40~50 年代就先后有人采用自身腹水经静脉直接

部梗塞的敏感性和危险性^[9]。为了进一步证实缺血性脑损伤中 TNF 的作用,Clark 等^[6]采用鼠 MCAO 模型直接在皮层和脑室内注射 TNF- α , 结果发现皮层内血管内皮上粘附大量的中性粒细胞,且一些细胞穿过血管壁而渗入脑组织,而对对照组与以往研究的脑缺血病理改变大致相同,未见有大量中性粒细胞浸润。他们认为这可能是 TNF 上调了粘附因子作用于内皮细胞的结果。此外,有实验表明脑缺血后 IL-1B 也与缺血产生白细胞浸润有关,但发现 TNF- α mRNA 的表达较 IL-1bRNA 表达早且持续时间长^[7],这些资料说明 TNF 在脑缺血后引起白细胞浸润和组织损伤中起重要作用。

以上几种炎性细胞因子的病理作用,均可诱导产生血小板活化因子(PAF)、促进白细胞聚集、激活小胶质细胞释放自由基加重脑缺血损伤。

在本实验过程中,假手术组仅分离双侧颈总动脉而未施行脑缺血,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 均数分别为 (0.061 \pm 0.006) ug/L、(0.072 \pm 0.004) ug/L、(0.396 \pm 0.026) ug/L。说明在正常情况下,这些细胞因子的表达水平较低。模型组、补阳还五汤组、标准对照组分别夹闭双侧颈总动脉而造成脑缺血,15min 后松开动脉夹造成再灌注损伤。从本实验结果中可以看出:术后 48h 模型组血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 均数分别是 (0.196 \pm 0.016) ug/L、(0.132 \pm 0.006) ug/L、(1.602 \pm 0.064) ug/L,显著高于假手术组 ($P < 0.01$),说明脑缺血再灌注促发产生 IL-1 β 、IL-6、TNF- α , IL-1 β 、IL-6、TNF- α 参与介导再灌注损伤,这与文献报道相一致^[8]。本实验中标准对照组在使用尼莫地平后,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 显著低于模型组 ($P < 0.01$),因此尼莫地平亦有抗脑缺血再灌注损伤的作用,但与补阳还五汤相比,仍有统计学差异 ($P < 0.01$)。补阳还五汤组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 均值分别是 (0.105 \pm 0.009) ug/L、(0.091 \pm 0.009) ug/L、(0.809 \pm 0.040) ug/L,明显低于模型组和

尼莫地平组 ($P < 0.01$),说明补阳还五汤对抗脑缺血再灌注损伤后导致的炎性细胞因子的显著升高,阻止了 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达而防治再灌注损伤,疗效确切,但与假手术组相比,仍有显著性增高。因此,我们可以看出补阳还五汤对沙土鼠脑缺血再灌注损伤后的炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 均有明显的抑制作用,且各组之间差异呈显著性。

总之,补阳还五汤可使蒙古沙土鼠脑缺血再灌注损伤 48h 后外周血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量明显降低。补阳还五汤可拮抗脑缺血再灌注损伤后的炎性细胞因子,因而减轻脑缺血再灌注引起的损伤。

参考文献

- [1] Kirino T, Sanok. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia [J]. Acta Neuropathol Berl, 1984, 62: 201
- [2] Betz AL, Schielke GP, Yang GY. Interleukin-1 in cerebral ischemia [J]. Keio J Med, 1996, 45: 230
- [3] 黄旭升,朱克,任明,等.大鼠永久性脑缺血后白细胞介素-1 β 表达的研究 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2000, 26(1): 12
- [4] Schettini G, Grimalai M, Landolfi E. Role of interleukin-6 in the neuroendocrine system [J]. Acta Neurol (Napoli), 1991, 24(13): 361
- [5] Liu T, Clark R, Yong PR. Tumor necrosis factor in ischemic neurons [J]. Stroke, 1994, 25: 1481
- [6] Liu T, McDonnell PC, Young PR. Interleukin-1 β expression in ischemic rat cortex [J]. Stroke, 1993, 24: 1746
- [7] Liu T, Young PR, McDonnell PC, et al. Cytokine induced neutrophil chemoattractant mRNA expressed in cerebral ischemia [J]. Neurosci Lett, 1993, 164: 125
- [8] Krigelegler M. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant mRNA expressed in cerebral ischemia [J]. Neurosci Lett, 1993, 164: 125

(收稿日期: 2004-03-29)