

见表2。结果表明,离体条件下 HSYA 抑制小鼠肝匀浆脂质过氧化的作用呈明显的量效关系。

表2 HSYA 对小鼠肝匀浆脂质过氧化的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Inhibitory effect of HSYA on liver homogenate lipid peroxidation in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	A ₅₃₂	I ₁ /%
对照	-	1.856 $\pm$ 0.056	-
HSYA	179	1.808 $\pm$ 0.056	2.6
	358	1.573 $\pm$ 0.072***	15.2
	716	1.216 $\pm$ 0.032***	34.5
	1 073	1.036 $\pm$ 0.010***	44.2
	1 431	0.930 $\pm$ 0.023***	49.9
	1 789	0.808 $\pm$ 0.039***	56.5

与对照管比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control tube

3.3 HSYA 抑制羟自由基引发的红细胞膜破裂作用: 见表3。结果表明,离体条件下 HSYA 抑制羟自由基诱发红细胞膜破裂的作用呈明显量效关系。

表3 HSYA 对羟自由基引发的红细胞膜破裂的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Inhibitory effect of HSYA on hemolysis induced by hydroxyl radical ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	A ₅₀₀	I ₂ /%
对照	-	0.445 $\pm$ 0.016	-
HSYA	274.0	0.411 $\pm$ 0.018	7.6
	411.1	0.367 $\pm$ 0.038*	17.5
	548.1	0.317 $\pm$ 0.023**	28.8
	685.1	0.302 $\pm$ 0.071***	32.1

与对照管比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control tube

4 讨论

临床上红花以水煎液入药,可治疗多种血液循环障碍性心脑血管疾病。在组织缺血-再灌注、炎症

反应等过程中,自由基反应为一重要的损伤机制。红花水提液可清除自由基,抑制脂质过氧化反应^[1]。HSYA 为红花主要水溶性有效成分,其抗氧化作用尚未见报道。

$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系可通过 Fenton 反应产生羟自由基,引发脂质过氧化、蛋白质交联等反应,造成细胞膜破裂可导致组织坏死等后果。本实验结果表明 HSYA 可清除羟自由基,抑制脂质过氧化反应,保护细胞膜,提示其为红花水溶性抗氧化有效成分。HSYA 为查尔酮类结构,其分子中含多个酚羟基,其抗氧化药效可能与这些酚羟基的作用有关。在多种血瘀病症中,自由基反应对加剧血液循环障碍起了重要的作用,而红花有效成分 HSYA 的抗氧化效应对其活血化瘀的作用具一定的贡献。

红花为常用活血化瘀药,具抗血栓、抗心肌缺血、改善微循环、抗氧化等多方面的药理作用。HSYA 在红花中含量较高,溶解度好,在此基础上开发新型心血管药物,可望获得明显的经济与社会效益。本研究对于进一步阐明红花活血化瘀作用机制,指导红花及其制剂的临床应用具重要的意义。

References

- [1] Jin M, Li J R, Cai Y X, et al. Antioxidative effect of aqueous component of *Carthamus tinctorius* L. [J]. *J Cardiovasc Pulm Dis* (心肺血管病杂志), 1998, 17(4): 277-279.
- [2] Zang B X, Jin M, Si N, et al. Antagonistic effect of hydroxysafflor yellow A on the platelet activating factor receptor [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(9): 696-699.
- [3] Jin M, Gao Z C, Li J R, et al. Preparation of safflor yellow and hydroxy safflor yellow A by macroporous resin column chromatography [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(1): 25-28.
- [4] Jin M, Cai Y X, Li J R, et al. 1, 10-Phenanthroline- Fe^{2+} oxidative assay of hydroxyl radical produced by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1996, 23(6): 553-555.

清开灵有效组份对局灶性脑缺血大鼠脑组织细胞间黏附分子表达的影响

徐丽荣¹, 马世彬², 李澎涛³, 唐启盛^{4*}

- (1. 北京中医药大学 中医内科, 北京 100029; 2. 泰山医学院 免疫教研室, 山东 泰安 271000;
3. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029; 4. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

脑缺血后脑组织的炎症损伤反应因其预后差,

死亡率高, 而日益受到人们的关注, 已成为该领域的

* 收稿日期: 2003-09-25

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (973) 课题 (G1999054404)

作者简介: 徐丽荣(1972—), 女, 黑龙江人, 讲师, 现为北京中医药大学 2001 级中医内科脑病专业博士研究生, 主要从事中药对缺血性中风干预作用的实验研究。E-mail: maxuli@yaho.com

研究热点。此炎症反应是以脑血管内白细胞聚集并穿越血管壁,浸润脑组织,同时伴有微血管功能紊乱,局部脑组织中液体和血浆蛋白积聚为标志的急性炎症。白细胞转化为病源性细胞之前,必须与内皮紧密相连,只有当白细胞表面糖蛋白与内皮表面黏附分子相互作用后,方可与内皮紧密结合,快速进入脑实质。可见,循环中的白细胞黏附至微血管内皮起始了炎症反应,是脑组织炎性损伤的前提条件。清开灵注射液清热解毒,用于治疗脑血管疾病取得了很好的疗效^[1],本实验观察清开灵注射液的有效组份对脑缺血大鼠脑组织相关细胞黏附分子表达的影响,以探讨其对缺血后脑组织炎症反应的干预作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备与分组:健康雄性 SD 大鼠,体重 300~350 g,购自维通利华实验动物中心。动物按缺血 12 h 和 24 h 两个时间点随机分为两大组,每组又分为模型组、合方组、栀子苷组、黄芩苷组、胆酸组、珍珠母水解液组,另设 2 个正常组作为相应时段的对照组,共 14 组;根据 Longa 等^[2]报道的线栓法建立左侧大脑中动脉(MCAO)缺血模型,待清醒后,参照 Bederson 等^[3]评分方法选择入组大鼠,每组 10 只。

1.2 药物及给药方式:以清开灵注射液有效组份栀子苷、黄芩苷、胆酸、珍珠母制成 4 个注射液,分别是胆酸注射液(7 mg/mL)、黄芩苷注射液(5 mg/mL)、栀子苷注射液(25 mg/mL)、珍珠母水解液(50 mg/mL),合方为将以上 4 种组份按单组份含量等体积混合而成,以上注射液由本课题组提供;将临床常用量据体表面积折算后按 0.3 mL/100 g 给药,用生理盐水稀释相应药液至 0.9 mL/100 g。缺血 12 h 用药组于线栓前 1 h 第 1 次 ip 给药,线栓后 4 h 第 2 次 ip 给药;缺血 24 h 用药组于线栓前 1 h 第 1 次 ip 给药,线栓后 4 h 第 2 次 ip 给药,12 h 第 3 次 ip 给药。模型组与对照组于相应时间 ip 等量生理盐水。

1.3 标本留取:按分组规定的时间以 10% 水合氯醛麻醉断头,于冰盘上剥离软脑膜,吸净表面血液,取视交叉处至小脑前部缺血侧大脑,称质量,以冷生理盐水研磨成 40% 脑组织匀浆,15 000 r/min 低温离心机 4℃ 离心 10 min,取上清液。

1.4 细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和 E-选择素(E-selectin)的 ELISA 法测定:试剂盒购自美国 TBI 公司,按盒内说明书操作。

1.5 数据统计:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行组间 t 检验。

2 结果

2.1 脑缺血不同时段缺血脑组织 ICAM-1 的表达:见表 1。脑缺血 12, 24 h 时,模型组大鼠脑组织 ICAM-1 表达水平均高于正常组($P < 0.05, 0.01$)。缺血 12 h, 珍珠母组、黄芩苷组及合方组 ICAM-1 水平低于模型组($P < 0.05, 0.01$),且黄芩苷组 ICAM-1 表达水平低于正常组($P < 0.01$),说明在此时段珍珠母及合方可阻抑脑组织中 ICAM-1 高表达,黄芩苷作用更显著,可使其表达低于正常水平;脑缺血 24 h,除合方组外各用药组 ICAM-1 表达水平均低于模型组($P < 0.01$),提示相应组份在此时段均有阻抑 ICAM-1 高表达的作用。

表 1 缺血脑组织 ICAM-1 的表达水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Expression of ICAM-1 in tissue of cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂 量	ICAM-1/(ng · mL ⁻¹)	
		缺血 12 h	缺血 24 h
正常	-	0.688±0.209	1.110±0.369
模型	-	0.861±0.109 [△]	1.670±0.318 ^{△△}
珍珠母	150 mg · kg ⁻¹	0.737±0.135 [*]	0.971±0.296 ^{**}
栀子苷	75 mg · kg ⁻¹	0.848±0.135 [△]	0.852±0.238 ^{**}
胆酸	21 mg · kg ⁻¹	0.795±0.250	0.919±0.074 ^{**}
黄芩苷	15 mg · kg ⁻¹	0.269±0.117 ^{△△*}	1.030±0.208 ^{**}
合方	3 mL · kg ⁻¹	0.598±0.067 ^{**}	1.530±0.350 ^{△△}

与正常组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

与模型组比较: $* P < 0.05$ $** P < 0.01$

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal group

$* P < 0.05$ $** P < 0.01$ vs model group

2.2 脑缺血不同时段缺血脑组织 E-selectin 的表达:见表 2。脑缺血后 12, 24 h, 模型组大鼠脑组织 E-selectin 表达水平高于正常组($P < 0.05, 0.01$)。缺血 12 h, 栀子苷组、胆酸组、黄芩苷组及合方组脑组织 E-selectin 水平低于模型组($P < 0.05, 0.01$),

表 2 缺血脑组织 E-selectin 的表达水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Expression of E-selectin in tissue of cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂 量	E-selectin/(ng · mL ⁻¹)	
		缺血 12 h	缺血 24 h
正常	-	22.86±2.89	13.06±2.94
模型	-	26.74±2.59 ^{△△}	16.87±4.43 [△]
珍珠母	150 mg · kg ⁻¹	26.92±4.97 [△]	15.36±3.65
栀子苷	75 mg · kg ⁻¹	23.56±3.64 [*]	8.42±2.06 ^{△△*}
胆酸	21 mg · kg ⁻¹	23.40±3.63 [*]	10.54±1.80 ^{△△*}
黄芩苷	15 mg · kg ⁻¹	17.12±2.10 ^{△△*}	12.95±3.26 [*]
合方	3 mL · kg ⁻¹	21.18±2.34 ^{**}	11.54±1.71 ^{**}

与正常组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

与模型组比较: $* P < 0.05$ $** P < 0.01$

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal group

$* P < 0.05$ $** P < 0.01$ vs model group

且黄芩苷组 E-selectin 表达水平低于正常组 ($P < 0.01$), 说明在此时段栀子苷、胆酸、合方均可抑制脑组织中 E-selectin 表达, 黄芩苷具有较强抑制作用, 使其表达低于正常; 缺血 24 h, 栀子苷组、胆酸组、黄芩苷组及合方组脑组织 E-selectin 表达水平低于模型组 ($P < 0.05, 0.01$), 且栀子苷组、胆酸组低于正常组 ($P < 0.05, 0.01$), 提示合方、黄芩苷可抑制脑组织中 E-selectin 高表达, 栀子苷、胆酸具有较强地抑制 E-selectin 的表达的作用, 使其表达水平低于正常。

3 讨论

白细胞与内皮细胞黏附的病理过程有初级黏附、牢固黏附、跨壁游走 3 个阶段。E-selectin 和 ICAM-1 是其中较重要的两个细胞黏附分子。E-selectin 只在血管内皮表达, 静息时表达很少, 炎症因子刺激可导致其激活^[4]。E-selectin 不仅可将中性粒细胞吸引到内皮细胞介导初级黏附, 还可激活白细胞表面的 CD18 抗原, 增加整合素 (integrin) 的表达, 使中性粒细胞上的 CR_3 结合活性增高, 促进中性粒细胞聚集及其与内皮细胞的牢固黏附; Zhang 等发现在不同大鼠缺血模型中, E-selectin 在缺血 2 h 开始表达, 于再灌注 6 h 至 12 h 达峰^[5]; Zhang 等应用模拟配体 CY-1503 可显著降低梗死面积, 显著减少中性粒细胞髓过氧化物酶 (MPO) 阳性细胞数, 提供了 E-selectin 参与 MCAO 大鼠脑损伤的直接证据^[6]; 在 CD18、CD62E 基因共同敲除的小鼠出现明显的炎症反应缺陷, 说明 E-selectin 和 CD18 的共同作用是炎症过程中其他黏附因子所不能取代的^[7]; 非人灵长类 MCAO 模型脑组织的非缺血侧在缺血后 24 h E-selectin 有表达^[8], 可能是脑损伤后的转移因子激活了正常脑微血管内皮细胞。在本实验中, 脑缺血后不同时间点不同有效组份发挥作用的程度虽有差异, 但总体来说, 除珍珠母外, 其他各有效组份均能显著降低 MCAO 大鼠脑组织中 E-selectin 水平, 从而在初级黏附环节抑制白细胞与内皮细胞黏附, 干预二者的进一步牢固黏附, 通过以上两个途径达到抗炎的目的。

ICAM-1 主要在内皮细胞上经炎症诱导表达, 通过与白细胞表面的淋巴细胞功能相关抗原 (LFA-1) 相互作用介导白细胞与内皮细胞的牢固黏附及白细胞穿出血管壁。ICAM-1 在缺血侧半球于缺血后 3 h 开始表达, 6~12 h 达峰, 持续 72 h。免疫组化显示 ICAM-1 阳性颗粒出现在缺血中心区和半暗带的微血管内皮细胞上, 且从中心区向半

暗带有增加趋势^[9]。Kitagawa 等发现在永久性梗死区, 即使白细胞浸润数目相同, 而 ICAM-1 基因敲除小鼠较非敲除小鼠脑损伤区伤害程度明显减轻, 认为 ICAM-1 在脑微循环衰竭和梗死区的扩大及梗死加重过程中起重要作用^[10]。临床研究发现中风患者血浆 ICAM-1 表达的上调并与趋化因子协同作用, 引起中风最初 3 d 粒细胞的浸润^[11]。由本实验结果可以看出, 珍珠母、合方可使缺血 12 h 脑组织中 ICAM-1 回复至正常水平。黄芩苷具有较强的抑制 ICAM-1 表达作用; 除合方组外各有效组份可抑制脑缺血 24 h 脑组织 ICAM-1 高表达, 使其接近正常。缺血 12 h, 只有珍珠母、黄芩及合方有效, 而至缺血 24 h, 除合方外其他各药均有效, 这说明珍珠母、黄芩苷、合方在缺血早期即可发挥作用, 而经过一段时程之后, 栀子苷、胆酸也开始显效, 通过抑制炎症细胞的牢固黏附减轻炎症反应。

脑缺血 12、24 h MCAO 大鼠脑组织 ICAM-1、E-selectin 表达水平较正常组均显著增高, 且二者表达水平呈正相关 ($r = 1$)。黄芩苷对缺血 12 h 脑组织 ICAM-1 和 E-selectin 的表达均有较强的抑制作用, 与文献报道相一致^[12]; 栀子苷、胆酸对二者在缺血 24 h 的表达均有较强的抑制作用。珍珠母可抑制缺血后 ICAM-1 的表达而对 E-selectin 的表达不发挥显著作用。可见, 对不同指标起正向作用的有效组份不尽相同, 针对单一指标, 同一有效组份可在一个时段发挥作用而在另一个时段不发挥作用, 但不引起负向作用。对此, 可以从以下几点考虑: 第一, 清开灵的有效组份在细胞黏附环节发挥抑制作用, 有效组份可能只作用于细胞黏附的某一阶段或同时作用于不同阶段; 第二, 随着缺血级联反应时程的进展, 脑内环境是不断变化的, 有效组份经代谢在不同时程可能发挥不同作用; 第三, 各单一组份在 24 h 均能降低 ICAM-1 水平, 而这些组份合用的合方在此时间点作用不显著, 说明各有效组份抑制细胞黏附的作用不是简单的叠加; 第四, 某一有效组份在本实验中某时间点、某环节作用不显著并不能排除该中药在与方中其他药物配伍后发挥作用的可能。

总之, ICAM-1 和 E-selectin 作为重要的黏附因子加重了缺血后脑损伤, 清开灵有效组份可通过抑制黏附因子的表达, 从细胞黏附的不同阶段, 在缺血损伤的不同时程抑制细胞黏附, 减轻脑缺血后炎症反应。至于各有效组份是通过抑制 E-selectin 的表达从而降低 ICAM-1 水平, 还是同时对初级黏附、牢固黏附发挥作用, 有待进一步研究。

References

- [1] Guo X F, Lai S L. Meta-analysis of Qingkailing injection for treating acute stroke [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med* (广州中医药大学学报), 2000, 17(1): 9-14.
- [2] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [3] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [4] Bevilacqua M P, Stengelin S, Gimbrone M A, et al. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins [J]. *Science*, 1989, 243(4895): 1160.
- [5] Zhang R, Chopp M, Zhang Z, et al. The expression of P- and s in three models of middle cerebral artery occlusion [J]. *Brain Res*, 1998, 785(2): 207-214.
- [6] Zhang R L, Chopp M, Zhang Z G, et al. In focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16(6): 1126-1136.
- [7] Forlow S B, White E J, Barlow S C, et al. Severe inflammatory defect and reduced viability in CD18 and double-mutant mice [J]. *Clin Invest*, 2000, 106(12): 1457.
- [8] Haring H P, Berg E L, Tsurushita N, et al. Appears in non-ischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 1996, 27(8): 1386-1391.
- [9] Ge H, Wen Y, Yang G, et al. Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 in mouse focal cerebral ischemia model [J]. *Chin Med J*, 2000, 113(1): 75-79.
- [10] Kitagawa K, Matsumoto M, Mabuchi T, et al. Deficiency of intercellular adhesion molecule 1 attenuates microcirculatory disturbance and infarction size in focal cerebral ischemia [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18(2): 1336-1345.
- [11] Lindsberg P J, Capen O, Paetau A, et al. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke [J]. *Circulation*, 1996, 94(5): 939-945.
- [12] Wang W N, Cai D F, Lu C Z. Effects of baicalin on cerebral ischemia-reperfusion injury in diabetic rats [J]. *Chin J Integrated Tradit West Med Intens Crit Care* (中国中西医结合急救杂志), 2002, 9(2): 111-113.

养血清脑颗粒改善头痛头晕症状的临床观察

常蜀英¹, 常有进², 郝晓玲¹, 王北林¹, 祖玉梅^{*}

(1. 空军总医院 门诊部, 北京 100036; 2. 沈阳炮兵学院 门诊部, 辽宁 沈阳 110162)

养血清脑颗粒 (YXQN Granula) 由当归、川芎、熟地、白芍、珍珠母、决明子、夏枯草、细辛等 20 余味中药合理配方、科学提取有效成分制成, 具有滋阴补血、平肝潜阳、活血通络的作用, 用于治疗偏头痛、血管紧张性头痛有良好疗效^[1]。为进一步了解该药对神经系统疾病的治疗作用和机制, 对 54 例头痛头晕患者服用养血清脑颗粒的情况进行了观察, 并采用经颅血管彩色超声检查 (TCD) 对服药前后脑血管机能状况进行对比分析, 现报道如下。

1 临床资料

1.1 一般资料: 54 例观察对象均为 2002 年 6 月—2003 年 6 月在本院神经内科门诊以头痛头晕症状为主诉的神经科疾病患者, 其中男性 28 例, 女性 26 例; 平均年龄 (55±17) 岁。

1.2 临床诊断及病程: 临床诊断分别为腔隙性脑梗死 21 例, 短暂脑缺血发作 2 例, 脑动脉硬化症合并脑供血不足 14 例, 脑出血后遗症 1 例, 脑膜瘤 1 例, 紧张性头痛 11 例, 偏头痛 4 例; 54 例中合并高血压病 25 例 (21 kPa/12 kPa), 合并颈椎病或颈椎曲度异常 25 例, 合并高脂血症 14 例, 高血糖 4 例。其中以

头痛症状为主诉者 16 例, 头痛头晕者 16 例, 头晕头昏者 22 例。间断头痛头晕病程 1~30 年, 平均 (47±76) 个月; 就诊时症状发作时间平均 (31±30) d。

2 方法

2.1 服药: 口服养血清脑颗粒 (天津天士力联合制药有限公司生产, 批号为 20020123, 20020916, 20021143, 20021206, 规格 4.0 g/袋), 每次 1 袋, 每天 3 次, 平均 28 d 连续服药。此期间尽可能不用其他治疗药物, 原用降压药者视情况减量或停止服用。

2.2 疗效评定指标: ①阳性次数积分: 记录服药当日及平均服药 28 d 后头痛头晕症状发作次数, 单有头痛或头晕一项记 1 分, 同时有头痛头晕者 2 分, 症状消失为 0 分; ②程度积分: 采用数字分级法 (NRS): 0~10 的数字代表不同程度的疼痛和头晕, 0 为无头痛和头晕, 10 为最剧烈的疼痛和头晕, 1~3 为轻度, 4~6 为中度, 7~10 为重度。

2.3 TCD 检查方法: 采用 EME TC2000 型经颅多普勒超声血流分析仪, 用 2 MHz 探头分别经颞窗、眶窗和枕窗探测每例患者服药前后左侧和右侧大脑中动脉 (LMCA, RMCA), 左侧和右侧大脑前动脉