

益元活血丹和大黄及其配伍对老龄大鼠 脑缺血细胞因子的影响

王至婉* 李建生* 周清安* 郭胜典* 侯秀娟* 李小黎*

摘要 目的:从细胞因子方面研究老龄大鼠脑缺血的发病机制和中药的防治作用。方法:老龄大鼠分为老龄对照组、老龄模型组、尼莫地平组、大黄组、益元活血组、益元活血大黄组,观察脑缺血模型白细胞介素 1(IL-1),白细胞介素 6(IL-6),白细胞介素 8(IL-8),肿瘤坏死因子(TNF α),转化生长因子(TGF α)和胰岛素样生长因子-2(IGF-2)含量的变化。结果:老龄模型组血清 IL-1 和 IL-8、血清与脑组织 IL-6 和 TNF α 含量高于老龄对照组,而 TGF α 和 IGF-2 含量降低($P<0.01$, $P<0.05$);与老龄模型组比较,大黄组脑组织 IL-6、血清 IL-8、血清和脑组织 TNF α 降低,而血清 TGF α 含量增高($P<0.01$, $P<0.05$);益元活血组、益元活血大黄组血清 IL-1 和 IL-8、血清与脑组织 IL-6 和 TNF α 含量降低,而 TGF α 和 IGF-2 含量增高($P<0.01$, $P<0.05$)。益元活血大黄组血清 TNF α 含量低于大黄组($P<0.05$)。结论:老龄大鼠脑缺血损伤与细胞因子网络紊乱有关;益元活血丹和大黄及其配伍对老龄大鼠脑缺血损伤有一定的保护作用。

主题词 脑缺血/血液 大黄/药理学 @ 益元活血丹

研究表明,细胞因子的变化与脑缺血损伤有着密切关系,调节细胞因子网络紊乱可能是防治脑缺血性损伤的主要途径。因此,以这些指标来探讨补肾活血方药益元活血丹和泻下方药大黄及其配伍对老龄大鼠脑缺血细胞因子的影响,进而探讨老年人脑梗塞的发病机制和上述药物对其影响具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

动物:雄性 SD 老龄大鼠 48 只,20~22 月龄。由河南省实验动物中心提供。大鼠合格证号:医动字第 99011 号。药物:尼莫地平片(规格 20mg/片,批号 9911049),由山东新华制药有限公司提供。生大黄购于河南省药材公司,经本院中药鉴定教研室鉴定为北大黄。益元活血丹胶囊(由何首乌、黄精、沙苑子、肉苁蓉、牛膝、三七、蒲黄、葛根、香附组成,每粒 0.5g,含原生药 2g,批号 9905201),由本院第一附属医院制剂室提供。试剂:白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8)、肿瘤坏死因子(TNF α)、转化生长

因子(TGF α)、胰岛素样生长因子-2(IGF-2),由解放军总医院科技开发中心放免研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 模型:采用二血管阻断方法。将大鼠用氯胺酮麻醉(1000mg/kg, ip),颈正中切口,分离双侧颈总动脉(CCA),并结扎 48 小时,缝合皮肤。对照组动物仅在双侧 CCA 穿线,不进行结扎处理。

1.2.2 分组与处理:老龄大鼠分为老龄对照组、老龄模型组、尼莫地平组、大黄组、益元活血组、益元活血大黄组,每组 8 只。老龄对照组和老龄模型组造模前 5 天及造模期间灌胃羧甲基纤维素,每日 1 次,处死前 2 小时加灌胃 1 次。尼莫地平组、益元活血组、大黄组、益元活血大黄组,造模前 5 天及造模期间分别灌胃尼莫地平片(6mg $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ d $^{-1}$)、益元活血丹(0.67g $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ d $^{-1}$)、大黄粉(0.45g $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ d $^{-1}$)、益元活血丹(0.67g $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ d $^{-1}$)和大黄粉(0.45g $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ d $^{-1}$),均每日 1 次灌胃,处死前 2 小时加灌胃 1 次。

腹主动脉取血,制备血清,测定 IL-1, IL-6, TNF α , TGF α , IGF-2。冰盘上分离大脑半球,生理盐水冲洗 3 次,除去积血并吸干水分,速冻待测有关指标。

1.2.3 指标测定

血清指标:IL-1、IL-6、IL-8、TNF α 、TGF α 、IGF-2,采用放射免疫法测定。

脑组织指标:IL-6、TNF α 、TGF α 、IGF-2。右侧脑组织称重后置微型匀浆器中,加生理盐水充分研磨制成匀浆, -20℃ 保存,测定前 4℃ 离心 3500rpm 15min,取上清。采用放射免疫法测定。

1.2.4 统计学处理:计量资料应用 SPSS 10.0 for Windows,采用单因素方差分析方法,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 各组间血清 IL-1 和 IL-8、血清及脑组织 IL-6 含量的变化:表 1 示,老龄模型组血清 IL-1 含量高于老龄对照组($P<0.01$)。与老龄模型组比较,尼莫地平组、益元活血组和益元活血大黄组血清 IL-1 含量降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

老龄模型组血清与脑组织 IL-6 含量高于老龄对照组($P<0.05$)。与老龄模型组比较,尼莫地平组和大

基金项目:河南省高校创新人才培养基金(2000-10)、河南省杰出科研人才基金(0221001700)

* 河南中医学院老年医学研究所,郑州市金水路 1 号(450003)

收稿日期:2002-11-04;修回日期:2003-01-06

表1 各组间 IL-1、IL-6、IL-8 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血清 IL-1(ng/ml)	IL-6		血清 IL-8(ng/ml)
			血清(pg/ml)	脑组织(pg/ml)	
老龄对照组	8	0.178±0.090**	101.954±25.850*	1.011±0.194*	0.516±0.047**
老龄模型组	8	0.282±0.069	134.097±34.117	1.251±0.266	0.664±0.092
尼莫地平组	8	0.198±0.067*	127.376±23.514	1.033±0.146*	0.598±0.083
大黄组	8	0.214±0.063	123.779±22.057	1.035±0.143*	0.535±0.052**
益元活血组	8	0.191±0.039*	90.281±28.038**	0.980±0.143*	0.575±0.073*
益元活血大黄组	8	0.136±0.057**	86.727±32.349**	0.890±0.166**	0.550±0.052**

与老龄模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表2 各组间血清及脑组织 TNF α 、TGF α 、IGF-2 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF α		TGF α		IGF-2	
		血清(ng/ml)	脑组织(pg/mg)	血清(pg/ml)	脑组织(pg/mg)	血清(ng/ml)	脑组织(pg/mg)
老龄对照组	8	1.853±0.473**	6.444±1.431**	33.111±6.623**	0.102±0.021*	0.380±0.064*	3.494±0.405*
老龄模型组	8	2.857±0.453	8.950±1.224	12.367±4.674	0.079±0.023	0.246±0.069	2.914±0.578
尼莫地平组	8	2.325±0.352**	7.750±1.220	22.038±5.220**	0.085±0.013	0.289±0.082	3.189±0.513
大黄组	8	2.089±0.319**	7.100±1.167*	21.073±4.713*	0.087±0.017	0.318±0.056	3.050±0.419
益元活血组	8	1.668±0.361** Δ	6.575±1.567**	18.455±7.252	0.105±0.023*	0.359±0.076*	3.536±0.485*
益元活血大黄组	8	1.658±0.082** Δ $\blacktriangle$	6.075±1.084**	27.121±9.045**	0.107±0.025*	0.386±0.035*	3.707±0.580**

与老龄模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与尼莫地平组比较, $\Delta P < 0.01$; 与大黄组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

黄组脑组织、益元活血组和益元活血大黄组血清与脑组织 IL-6 含量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

老龄模型组血清 IL-8 含量高于老龄对照组($P < 0.01$)。与老龄模型组比较, 益元活血组、大黄组和益元活血大黄组血清 IL-8 含量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.2 各组间血清及脑组织 TNF α 、TGF α 、IGF-2 含量变化: 表2示, 老龄模型组血清与脑组织 TNF α 含量高于老龄对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与老龄模型组比较, 尼莫地平组血清与血清、益元活血组、益元活血大黄组血清和脑组织 TNF α 含量皆显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 益元活血组与益元活血大黄组血清 TNF α 含量较尼莫地平组差异有显著性($P < 0.01$); 益元活血大黄组血清 TNF α 含量低于大黄组($P < 0.05$)。老龄模型组血清和脑组织 TGF α 含量较老龄对照组降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与老龄模型组比较, 尼莫地平组和大黄组血清、益元活血组脑组织、益元活血大黄组血清与脑组织 TGF α 含量增高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。老龄模型组血清和脑组织 IGF-2 含量低于老龄对照组($P < 0.05$)。与老龄模型组比较, 益元活血组、益元活血大黄组血清与脑组织 IGF-2 含量增高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 讨论

近年来, 细胞因子与脑缺血性损伤关系倍受关注。脑缺血触发炎症细胞因子如 IL-1, IL-6, IL-8, 或肿瘤坏死因子(TNF)的合成和释放, 引起缺血区微血管阻塞, 导致小胶质细胞和白细胞被激活, 多形核白细胞(PMNLs)侵入损伤脑区, 该区出现渗出液, 发生

水肿, 产生炎症反应, 炎症本身产生自由基, 加重脑缺血性损伤。以这些指标来探讨益元活血丹和大黄及其配伍对老龄大鼠脑缺血细胞因子的影响, 为揭示老年人脑梗塞的病理特点和上述药物的临床应用提供科学依据。

本实验结果显示, 老龄模型组血清 IL-1 水平较老龄对照组升高($P < 0.01$)。表明 IL-1 水平的升高参与脑缺血损伤。研究发现, 给缺血大鼠脑室内注入 IL-1 受体拮抗剂, 则梗塞体积明显缩小而不影响大鼠心率、血压和体温^[1]。可见, 降低 IL-1 水平对保护脑缺血损伤具有重要意义。本组资料显示, 益元活血组和益元活血大黄组血清 IL-1 含量较老龄模型组降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。表明益元活血丹和与大黄配伍通过降低 IL-1 的水平而减缓脑组织损伤, 这可能是益元活血丹和与大黄配伍防治脑梗塞的作用机制之一。

随着分子生物学技术的发展, IL-6 作为一种致炎细胞因子, 在缺血性脑血管病中的作用日益受到众多学者的关注。Fassbender 等^[2]报道, 急性脑梗塞病人发病 1 小时内血清 IL-6 明显升高, 在 10 小时~3 天维持在高水平。临床研究发现, 脑梗塞后 IL-6 水平的升高和神经损伤的程度、梗塞体积的大小、急性期反应物水平的高低有密切的关系^[3]。可见, IL-6 水平的升高与脑缺血损伤有密切关系, 如本研究显示, 老龄模型组血清和脑组织 IL-6 水平均较老龄对照组增高($P < 0.05$)。而用药各组能够不同程度降低老龄大鼠缺血后脑组织 IL-6 的含量($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且益元活血组和益元活血大黄组血清 IL-6 含量的降低较老龄模

型组显著($P<0.01$)。表明益元活血丹和与大黄的配伍作用较为明显而全面。提示益元活血丹和大黄及其配伍通过降低 IL-6 的含量,从而改善微循环,改善缺血后的炎症反应,对缺血脑组织具有防护作用。

IL-8 作为致炎细胞因子在神经系统疾病中发挥着重要的作用。其生物学活性是趋化和激活中性粒细胞。本组资料表明,老龄模型组血清 IL-8 的含量高于老龄对照组($P<0.01$)。提示 IL-8 水平升高参与脑缺血损伤。用抗 IL-8 抗体预处理,结果表明该抗体能抑制中性粒细胞浸润以及组织损伤^[4]。Matsumoto 等^[5]报道,抗 IL-8 抗体能缓解脑缺血再灌注引起的脑水肿,缩小梗塞体积。可见,降低 IL-8 的含量是治疗缺血性脑损伤后炎症反应的途径。本实验结果表明,益元活血组、大黄组和益元活血大黄组血清 IL-8 含量降低($P<0.05$, $P<0.01$),提示益元活血丹和大黄及其配伍通过降低 IL-8 水平从而消除炎症反应,对缺血性脑组织起保护作用。

TNF α 参与了缺血后脑组织的损害过程,本组资料表明,脑缺血后老龄大鼠血清及脑组织中 TNF α 含量高于老龄对照组($P<0.01$)。提示脑缺血后,TNF α 合成机制被激活,导致其大量表达,促进脑组织损伤。研究发现,脑局部应用抗大鼠 TNF 抗体(p114)使脑梗塞体积较预免疫处理组减少 85%,全身用药 N1-1493(抑制内源性脑 TNF 合成制剂)可使梗塞体积较对照组减少 80%^[6]。可见,阻断 TNF α 作用可能对脑缺血有益。本研究表明,尼莫地平组、大黄组、益元活血组和益元活血大黄组有不同程度的降低 TNF α 含量的作用,较老龄模型组差异有显著性($P<0.05$, $P<0.01$)。提示各用药组通过降低 TNF α 含量而对脑缺血有一定的改善作用,这可能是防治老年人脑梗塞的作用机制之一。其中益元活血组、益元活血大黄组血清 TNF α 含量较尼莫地平组降低($P<0.01$)。益元活血大黄组血清 TNF α 水平低于大黄组($P<0.05$)。表明益元活血丹和与大黄的配伍作用较为明显而全面,尤其是二者的配伍其效果优于单味大黄。

TGF β 作为神经营养因子,能延长神经细胞存活时间,抑制其凋亡,并对神经损伤进行修复。缺血后 TGF β 含量发生改变。本组资料中,老龄大鼠脑缺血后 48 小时其血清和脑组织 TGF 水平低于老龄对照组($P<0.01$, $P<0.05$)。提示脑缺血后神经细胞受到损伤,导致 TGF β 的合成减少。可见,增高 TGF β 含量对脑组织具有保护作用。Justicia 等^[7]研究发现,外源性 TGF β 能明显缩小短暂性缺血性大鼠脑梗塞体积。本组资料中大黄组血清、益元活血组脑组织、益元活血大黄组血

清与脑组织 TGF β 含量较老龄模型组增高($P<0.05$, $P<0.01$)。表明益元活血丹和大黄及其配伍通过升高 TGF β 水平而发挥神经保护作用,尤其是二者配伍的作用较为全面且明显。

IGF-2 属于多肽类的胰岛素家族。作为神经营养因子,促进神经元和神经胶质细胞的增殖和分化。脑缺血时血清和脑组织 IGF-2 含量降低($P<0.05$),降低了脑组织的保护作用。实验证明,含有抗 IGF-2 的抗体血清能增加凋亡的神经细胞数。表明 IGF-2 含量降低能诱导神经元的凋亡^[8]。缺血前用 Ins/IGFs 预处置,可减少大鼠脑缺血区凋亡细胞数、缩小其梗塞体积^[9]。可见,提高 IGF-2 对保护脑缺血损伤具有重要意义。本实验结果表明,益元活血组、益元活血大黄组血清和脑组织 IGF-2 的含量增加($P<0.05$, $P<0.01$)。表明益元活血丹和与大黄的配伍可通过提高 IGF-2 的含量而对缺血脑组织具有保护作用。

参考文献

- 1 Loddick SA, Rothwell NJ. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16(5): 932-940.
- 2 Fassbender K, Rossol S, Kammer T, et al. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia; Kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J Neurol Sci*, 1994, 122(2): 135-139.
- 3 Vila N, Castillo J, Davalos A, et al. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke*, 2000, 31(10): 2325-2329.
- 4 Mukaida N, Matsumoto T, Yokoi K, et al. Inhibition of neutrophil-mediated acute inflammation injury by an antibody against interleukin-8(IL-8). *Inflamm Res*, 1998, 47(Suppl 3): S151-157.
- 5 Matsumoto T, Ikeda K, Mukaida N, et al. Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8. *Lab Invest*, 1997, 77(2): 119-125.
- 6 Meistrell ME, Botchkina GI, Wang H, et al. Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock*, 1997, 8(5): 341-348.
- 7 Justicia C, Perez-Asensio FJ, Burguete MC, et al. Administration of transforming growth factor- α reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(9): 1097-1104.
- 8 Pu SF, Zhuang HX, Marsh DJ, et al. Insulin-like growth factor- I increases and IGF is required for postnatal rat spinal motoneuron survival following sciatic nerve axotomy. *J Neurosci Res*, 1999, 55(1): 9-16.
- 9 Tagami M, Yamagata K, Ikeda K, et al. Genetic vulnerability of cortical neurons isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats in hypoxia and oxygen reperfusion. *Hypertens Res*, 1999, 22(1): 23-29.

更正:本刊 2003 年第 11 期 848 页文章作者付丽丽单位应为“河南省南阳市中心医院”。