

丹参酮对脑梗死患者白细胞表面黏附分子表达的影响

李敬诚, 周华东, 张 猛, 陈曼娥

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科脑二科, 重庆 400042)

【摘要】 目的:通过对白细胞表面黏附分子表达的分析,探讨丹参酮治疗急性脑梗死的作用机制。**方法:**采用双盲随机对照方法将 80 例急性脑梗死患者分为两组,治疗组给予丹参酮注射液 2 ml,对照组给予注射用水,两组分别溶于生理盐水 250 ml 静脉滴注,每日 1 次,连用 7 d。两组于治疗前后取外周血分离多形核白细胞(PMN),应用间接免疫荧光标记,流式细胞仪检测白细胞表面黏附分子 CD11a、CD18、CD18/CD11a(LFA-1)免疫阳性细胞数;应用透射电镜观察外周血 PMN 超微结构变化。**结果:**丹参酮能明显降低外周血白细胞表面黏附分子 CD11a、CD18、LFA-1 免疫阳性细胞数;PMN 超微结构显示,与治疗组比较,对照组胞浆电子密度降低,内质网扩大,部分线粒体嵴断裂,核周间隙增高,核浆比例增大均更加明显。**结论:**丹参酮抑制白细胞表面黏附分子 CD11a、CD18、LFA-1 的表达,阻断白细胞与血管内皮细胞黏附,在脑梗死治疗中具有保护神经细胞的作用。

【关键词】 脑梗死;丹参酮;细胞黏附分子

中图分类号: R285.6; R277.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-9691(2006)05-0263-03

Role of sulfotanshinone sodium (丹参酮) on polymorphonuclear adhesion molecule expression in cases with acute cerebral infarction LI Jing-cheng, ZHOU Hua-dong, ZHANG Meng, CHEN Man-e. Department of Neurology, Daping Hospital, The Third Military Medical University of PLA, Chongqing 400042, China
Corresponding author: ZHOU Hua-dong (Email: zhouhuad@163.com)

【Abstract】 Objective: To investigate the role of sulfotanshinone sodium (丹参酮) for treatment of acute cerebral infarction (ACI) and its mechanism by accessing the expression of adhesion molecules of polymorphonuclear (PMN) cells. **Methods:** Eighty adult patients with ACI were randomly divided into sulfotanshinone group and control group according to double-blind, randomized and controlled study. Sulfotanshinone sodium (2 ml) dissolved in 250 ml of normal saline was intravenously dripped once a day in sulfotanshinone group ($n=65$), while water injectio (2 ml) in 250 ml of normal saline was intravenously dripped once a day in control group ($n=15$), the therapeutic course being 7 days. The percentages of CD11a, CD18 and CD18/CD11a (LFA-1) expression originated from PMN cells were measured with indirect immunofluorescence and flow cytometry, cellular ultrastructures of PMN cells in peripheral blood were observed by a transmission electron microscope before and after treatment and the two groups were compared. **Results:** Sulfotanshinone sodium could obviously decrease the numbers of immunopositive CD11a, CD18 and LFA-1 cells in blood. In comparison between the control group and the treatment group, the ultrastructural changes showed that the following items were more marked in the former group than those in the latter group: decrease in cytoplasmic electron density, dilatation of endoplasmic reticulum, breaks of mitochondria cristae, enlargement of perinuclear space and increase in karyoplasm proportion. **Conclusion:** Sulfotanshinone sodium may inhibit the expressions of CD11a, CD18 and LFA-1 adhesion molecules on the surface of white blood cells, prevent the adhesion of the cells onto the endothelium of microvessels and play a protective role on nerve cells in cases with ACI.

【Key words】 cerebral infarction; sulfotanshinone sodium; adhesion molecule

细胞黏附分子是介导细胞与细胞间、细胞与细胞基质间黏附的一类分子,以配体-受体结合的形式

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670268)

通讯作者:周华东 (Email: zhouhuad@163.com)

作者简介:李敬诚(1963-),男(汉族),重庆人,副教授,医学博士,从事脑血管病和神经变性疾病的研究 (Email: lijingcheng11@yahoo.com.cn)。

发挥作用。研究表明,细胞黏附分子在缺血性脑损伤发病机制中起重要作用^[1]。已证实中药丹参具有扩血管、改善血黏度和活血化瘀的作用,临床广泛用于治疗脑梗死^[2]。丹参酮为丹参中提取的单体成分,目前对脑梗死的治疗作用尚缺乏广泛临床试验。本研究通过分析脑梗死患者白细胞表面黏附分子

CD11a、CD18、CD18/CD11a (LFA-1) 免疫阳性细胞数的变化,探讨丹参酮对脑梗死治疗的作用机制。

1 资料与方法

1.1 病例资料:选择按中华神经科学会制定的脑血管病诊断标准^[3],并经颅脑 CT 扫描确诊的急性脑梗死患者 80 例,采用双盲对照方法随机分为两组。治疗组 42 例,男 22 例,女 20 例;年龄 52~78 岁,平均(66.2±7.4)岁。对照组 38 例,男 21 例,女 17 例;年龄 53~79 岁,平均(67.6±9.4)岁。排除曾有脑卒中史、肿瘤、自身免疫性疾病、感染[体温>37.5℃,白细胞计数(WBC)>10×10⁹/L,中性粒细胞>0.70]及严重合并症(心肌梗死、上消化道出血、糖尿病)等。两组患者年龄、性别、病程、神经功能缺损程度比较差异均无显著性(*P*均>0.05),有可比性。

1.2 治疗:治疗组予丹参酮注射液 2 ml[每支含 100 mg,阿尔贝拉医药控股(通化)有限公司];对照组给予注射用水;两组分别溶于生理盐水 250 ml 静脉滴注,每日 1 次,7 d 为 1 个疗程。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 多形核白细胞(PMN):采集治疗前后两组患者静脉血各 2 ml,肝素抗凝,用右旋糖酐沉降及 Percoll 梯度法分离 PMN,离心后备用。

1.3.2 白细胞表面黏附分子的检测:取 100 μl 分离的 PMN 悬浮液,加入鼠抗人 CD11a、CD18、LFA-1 单克隆抗体(单抗)20 μl(法国 IMMUNO TECH 公司产品),加入磷酸盐缓冲液(PBS),于 25℃室温下放置 15 min,过夜后加 500 μl 红细胞裂解液[体积分数分别为 0.83%的 NH₄、0.1%的 K₂HCO₃ 和 0.05 mmol 乙二胺四乙酸二钠(EDTA·Na₂),pH 7.3],混匀后于室温放置 10 min,离心去上清液,用 0.1 mol/L 的 PBS(pH 7.3)清洗 1 次,加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠二抗 20 μl(法国 IMMUNO TECH 公司产品)。然后用流式细胞仪(ELITE ESP, Coulter Co., USA)测量 CD11a、CD18 及 LFA-1 免疫阳性细胞数。在 Cell Quest 软件下,采用二维点图 Gate 白细胞分解,一维直方图进行特异性荧光分析,对每 5 000 个 PMN 中免疫阳性细胞数及百分率进行统计。

1.4 组织病理学观察:PMN 用体积分数为 3%的戊二醛固定 2 h 后,系列丙酮脱水,环氧树脂浸透包埋,超薄切片,铅-铀双染色后在 JEU22000EX 透射电镜下观察 PMN 超微结构变化。

1.5 疗效标准:根据 1995 年全国第 4 届脑血管病会议关于卒中患者临床神经功能缺损程度评分标

准,结合患者生活能力状态判定疗效。疗效分为:基本痊愈、显著进步、进步、无变化、恶化、死亡 6 项。显效率为基本痊愈+显著进步。

1.6 统计学处理:实验数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,行 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床疗效比较:治疗组显效率为 76.2% (32/42 例),对照组为 42.1% (16/38 例),两组比较差异有显著性(*P*<0.01)。

2.2 治疗前后白细胞表面黏附分子免疫阳性细胞数变化(表 1):治疗组治疗后白细胞表面黏附分子 CD11a、CD18、LFA-1 的免疫阳性细胞数较治疗前明显降低,且低于对照组治疗后(*P*均<0.05)。对照组治疗前后比较均无明显变化(*P*均>0.05)。

表 1 两组患者治疗前后白细胞表面黏附分子免疫阳性细胞数的变化($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Change of numbers of immunopositive adhesion molecule of polymorphonuclear before and after treatment in two groups($\bar{x}\pm s$) 个

组别	例数(例)	CD11a	CD18	LFA-1
治疗组	治疗前	42 1 704±228	2 352±247	1 518±221
	治疗后	42 813±106* [#]	1 476±201* [#]	876±87* [#]
对照组	治疗前	38 1 726±207	2 267±264	1 673±192
	治疗后	38 1 563±254	2 132±196	1 503±251

注:与本组治疗前比较:**P*<0.05;与对照组治疗后比较:[#]*P*<0.05

2.3 PMN 超微结构变化:与治疗组相比,对照组胞浆电子密度降低,内质网扩张,部分线粒体嵴断裂,核周间隙增宽,核浆比例增大均更加明显。

3 讨论

对细胞间的黏附现象人们早有认识,1980 年以来,分子生物学与免疫学技术的发展极大推动了黏附分子的研究。实验和临床研究已经证明,LFA-1 与配体细胞间黏附分子-1(ICAM-1)调节着 PMN 与血管内皮细胞黏附,参与了炎症反应及许多重要的生理和病理反应^[4-8]。研究表明,缺血性脑血管疾病的发生、发展与黏附分子作用密切相关,急性脑梗死于发病初期可溶性 ICAM-1、可溶性血管细胞黏附分子-1 表达增强^[9]。目前,防止脑缺血/再灌注损伤的方法很多,包括建立侧支循环、清除氧自由基和阻止钙超载等,但治疗效果均欠佳。如果能在缺血早期阻断白细胞和内皮细胞间的黏附过程,则可能使再灌注损伤的程度减轻、范围缩小。国外研究发现,ICAM-1 基因敲除的大鼠在局灶性脑缺血后,其微循环障碍和梗死灶体积均呈现明显的减小趋势^[10,11],而我国对中药抗黏附作用机制的研究尚处于起步阶段。

本试验研究表明,丹参酮治疗后,脑梗死患者外周血白细胞表面黏附分子 CD11a、CD18 及 LFA-1 阳性细胞数明显降低,与对照组相比差异有显著性;提示丹参酮具有封闭 LFA-1 抗原的作用。丹参酮增加血流量、改善微循环可能是部分通过抑制白细胞表面黏附分子表达而起作用。从电镜观察发现,丹参酮明显抑制 PMN 代谢,使白细胞活性减弱。白细胞表面黏附分子 CD18、CD11a 表达下调,白细胞与内皮细胞黏附性减弱,白细胞的聚集性和黏附性降低,不易在缺血区毛细血管内形成微栓子;白细胞不易穿出血管壁浸润到缺血区;此外,白细胞活性降低,使释放的血管活性物质、炎症介质明显减少,有助于改善微循环,减轻组织缺血、缺氧。

综上所述:我们的研究提示,丹参酮能抑制白细胞表面黏附分子 CD11a、CD18、LFA-1 的表达,阻断白细胞与血管内皮细胞黏附,在脑梗死的治疗中具有保护神经细胞的作用。

参考文献:

[1] Zhang R L, Chopp M, Jiang N, et al. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat[J]. Stroke, 1995, 26: 1438-1443.

- [2] 郑志远, 黄文起, 卢振和, 等. 丹参酮 I A 对兔脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 3: 1066-1068.
- [3] 李文慧. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29: 379-382.
- [4] Hsiao G, Lin K H, Chang Y, et al. Protective mechanisms of inosine in platelet activation and cerebral ischemic damage[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25: 1998-2004.
- [5] Michael D B, Byers D M, Irwin LN. Gene expression following traumatic brain injury in humans: analysis by microarray[J]. J Clin Neurosci, 2005, 12: 284-290.
- [6] 叶心园, 毛善平, 谭来勋. 急性脑梗死患者外周血细胞黏附分子和转化生长因子的变化及其意义[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 23-25.
- [7] 姜霞, 田凤石, 张秀泉, 等. 急性心肌梗死患者黏附分子及相关因素的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 615-617.
- [8] 占成业, 陶秀良, 田橙, 等. 细胞间黏附分子-1 在高血压左室肥厚发病中的作用及丹参酮 I A 对其表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11: 208-211.
- [9] 田凤石, 巩岩霞, 葛进, 等. 急性脑梗死患者可溶性细胞黏附分子及相关因素的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12: 751-752.
- [10] Ishikawa M, Vowinkel T, Stokes K Y, et al. CD40/CD40 ligand signaling in mouse cerebral microvasculature after focal ischemia/reperfusion[J]. Circulation, 2005, 111: 1690-1696.
- [11] Williams A J, Berti R, Dave J R, et al. Delayed treatment of ischemia/reperfusion brain injury: extended therapeutic window with the proteasome inhibitor MLN519[J]. Stroke, 2004, 35: 1186-1191.

(收稿日期: 2006-07-02 修回日期: 2006-07-17)

(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

中西医结合治疗梅尼埃病 30 例

黄素梅, 张勤生

(驻马店市第二中医院, 河南 驻马店 463000)

【关键词】 中西医结合治疗; 梅尼埃病; 仙鹤草; 三磷酸腺苷

中图分类号: R242 文献标识码: B 文章编号: 1008-9691(2006)05-0265-01

2003 年 10 月—2005 年 6 月, 我院应用仙鹤草和三磷酸腺苷(ATP)治疗梅尼埃病 30 例, 报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料: 梅尼埃病诊断根据卜行宽主编的《耳、鼻、喉科学》(2004 年 8 月第 1 版)标准。30 例患者年龄 32~35 岁, 平均(41.2±6.2)岁; 病程 1~10 年, 平均(4.3±3.5)年; 耳鸣和耳胀满 10 例, 自发性睡眠 4 例, 行走反常有偏向 4 例, 中耳炎 5 例, 继发性膜迷路积水疾病 5 例, 发作性眩晕感音神经听力损失 2 例。

1.2 治疗方法: 用草药仙鹤草 60 g 加水
作者简介: 黄素梅(1956-), 女(汉族), 河南新蔡人, 副主任医师。

500 ml, 煎至 300 ml, 每晚口服 1 次, 7~10 d 为 1 个疗程。同时加 ATP 120 mg, 分 3 次口服, 连服 10 d 为 1 个疗程。观察用药前后耳鸣、耳胀满感和发作性眩晕症状消失, 纯音测听感音神经听力恢复以及膜迷路积水消失变化情况。

1.3 结果: ①显效(症状消失), 纯音测听感音神经听力恢复, 膜迷路积水消失 20 例; ②有效(症状减轻), 纯音测听感音神经听力轻损, 膜迷路有轻微水肿 6 例; ③无效(症状无明显缓解甚至加重), 纯音测听感音神经听力损失 2 例, 膜迷路积水 2 例。总有效率为 86.7%。

随访结果: 停药 3 个月后复查, 症状不再复发, 纯音测听正常 20 例; 膜迷路

积水消失, 中耳炎好转 5 例; 3 例行行走反常, 偏向减轻, 犯病次数减少, 发作旋转性眩晕仅 1 次, 持续时间约 5~10 min, 间歇期无耳鸣、耳胀满感。

不良反应: 用药 10 d 后门诊复查肝功能无一例异常, 无胃肠道反应。

2 讨论

梅尼埃病发病年龄多为 30~50 岁, 常以单耳发病为主。仙鹤草的消炎利尿功能可以减轻膜迷路积水症状; ATP 为能量药物, 能营养耳蜗神经, 改善内耳血液循环, 减轻耳鸣、耳胀满和眩晕发作, 两药配伍效果好。

(收稿日期: 2006-01-12)

(本文编辑: 李银平)