

# 黄芪注射液对新生儿缺氧缺血性脑病的临床与免疫学机制研究

卓 名<sup>1a</sup>, 陈鸿莲<sup>1b</sup>, 蔡娜丽<sup>2</sup>, 张振英<sup>1c</sup>, 叶国杰<sup>1c</sup>

(1. 广东湛江中心人民医院①急诊科, ②ICU 科, ③儿科, 广东 湛江 524037;

2. 广东医学院附属医院儿科, 广东 湛江 524000)

**【摘要】** 目的 研究黄芪注射液治疗新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)的临床与免疫学机制。方法 选择 40 例 HIE 患儿,按入院时间顺序以单双号分为黄芪治疗组(20 例)及常规治疗组(20 例)。比较两组患儿治疗前后 HIE 临床症状消失时间、住院时间、器官功能障碍及合并症的发生率;检测治疗前后血浆及外周血单个核细胞(PBMC)体外产生白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平,同时观察黄芪注射液在体外对 PBMC 产生 IL-6 及 TNF- $\alpha$  能力的直接影响。结果 与常规治疗相比较,黄芪注射液治疗后患儿异常的原始反射、肌张力、意识障碍及惊厥等症状消失时间明显缩短( $P$  均 $<0.05$ ),住院时间明显缩短( $P$  均 $<0.05$ );心功能损害、肾功能损害、高胆红素血症及院内感染发生率均明显降低( $P$  均 $<0.05$ )。黄芪注射液治疗后血浆及 PBMC IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平均明显低于治疗前( $P$  均 $<0.01$ );而常规治疗前后上述指标均无明显变化。将黄芪注射液直接加入 PBMC 培养系统后,其 IL-6 及 TNF- $\alpha$  产生明显受抑制( $P$  均 $<0.05$ )。结论 黄芪可能通过抑制 PBMC 产生 IL-6 及 TNF- $\alpha$  等损伤性细胞因子,发挥减轻脑损伤及多器官功能损害、缩短病程等疗效。

**【关键词】** 脑缺氧; 脑缺血; 黄芪注射液; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

中图分类号:R285.6;R722.1 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)01-0013-03

**A study on clinical effects and immunological mechanism of intravenous Astragalus injection (黄芪注射液) therapy in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy** ZHUO Ming<sup>1a</sup>, CHEN Hong-lian<sup>1b</sup>, CAI Na-li<sup>2</sup>, ZHANG Zhen-ying<sup>1c</sup>, YE Guo-jie<sup>1c</sup>. 1. ①Department of Emergency, ②Intensive Care Unit, ③Department of Pediatrics, Zhanjiang Central People's Hospital, Zhanjiang 524037, Guangdong, China; 2. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524000, Guangdong, China

**【Abstract】** Objective: To investigate the therapeutic effects and possible immunological mechanism of intravenous injection of Astragalus (黄芪注射液) in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy (HIE). **Methods:** Forty neonates with HIE were divided with the odd or even number of the order for hospitalization into two groups: routine ( $n=20$ ) and Astragalus treatment groups ( $n=20$ ). The recovery time of various features of HIE, the time of hospitalization, and the rate of occurrence of organ dysfunctions and complication were compared between the two groups. The interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the plasma and in the supernatant of cultured peripheral blood mononuclearcytes (PBMC) were measured before and after the treatment. Meanwhile, the direct effects of Astragalus injection in vitro on IL-6 and TNF- $\alpha$  production of PBMC were also detected. **Results:** Compared with the routine treatment group, the recovery time of the abnormal primitive reflexes, muscular tone, disturbance of consciousness and seizures and the time for hospitalization were significantly shortened in intravenous Astragalus treatment group (all  $P<0.05$ ). The incidences of cardiac and renal damages, hyperbilirubinemia and nosocomial infections were markedly decreased (all  $P<0.05$ ). The levels (median) of IL-6 and TNF- $\alpha$  both in the plasma and in the supernatant of PBMC after Astragalus treatment were markedly lower than those before the Astragalus treatment (all  $P<0.01$ ). There were no significant differences in routine group before and after the treatment. The levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  production were obviously inhibited with the exposure to Astragalus in vitro in the cultured PBMC of HIE patients (both  $P<0.05$ ). **Conclusion:** Astragalus might relieve the cerebral damages, multiple organ dysfunctions and shorten the course of HIE by the inhibition of PBMC to produce IL-6 and TNF- $\alpha$  which are injurious cellular factors.

**【Key words】** cerebral anoxia; cerebral ischemia; intravenous injection of Astragalus; interleukin-6; tumor necrosis factor- $\alpha$

基金项目:广东省医学科学科研基金资助项目(A2003782)

作者简介:卓 名(1969-),男(汉族),广东省人,副教授,副主任医师,Email:zhuoming\_zj@163.com.

近年研究表明,免疫系统及其功能异常可能参与了新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)的发病<sup>[1]</sup>,利用免疫疗法治疗 HIE 已具有潜在的可能性。研究发现黄芪及其多糖能对抗免疫抑制剂,因此,目前黄芪制剂可能通过调节黏附分子表达水平<sup>[2]</sup>、减少自由基生成和增加其清除量<sup>[3]</sup>、调节 T 淋巴细胞各亚群比例及免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM)的含量<sup>[4]</sup>等机制,被广泛用于多种免疫相关性疾病的治疗。国内已有相关应用黄芪制剂治疗 HIE 的研究,发现其能有效地改善预后,机制可能与抑制炎症介质、促进抑凋亡基因 Bcl-2 蛋白表达、下调促凋亡 Fas-L 蛋白表达,降低脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡数目、调节凋亡相关基因表达等<sup>[5-7]</sup>有关,但尚缺乏系统性研究,尤其是对免疫功能的影响及治疗 HIE 的相关机制研究。现将我们使用黄芪注射液治疗 HIE 的临床及免疫学结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象:按照 HIE 诊断标准<sup>[8]</sup>,选择 40 例足月新生儿,根据入院顺序按单双号分组。常规治疗组 20 例中男 10 例,女 10 例;入院后给予维生素 E、胞二磷胆碱及其他脑保护剂治疗;黄芪治疗组 20 例中男 12 例,女 8 例;在常规治疗基础上,于病程的 1 h 内静脉输注黄芪注射液 2 ml/d,14 d 为 1 个疗程。于治疗前后分别采集外周血备测,观察记录治疗前后临床疗效及检测指标的变化。选择同期健康足月新生儿 20 例,其中男 12 例,女 8 例;采集脐带血备测。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 外周血单个核细胞(PBMC)分离及培养:以淋巴细胞分离液(上海试剂二厂产品)分离 PBMC,洗涤后经植物血凝素(PHA,广州医学工业研究所)诱导,用 RPMI1640(Gibco,USA)在 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下培养 72 h,取上清液-20 ℃ 保存。

1.2.2 血浆及 PBMC 体外培养液中白细胞介素-6

(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)检测:采用鼠抗人单克隆抗体酶联免疫吸附法(ELISA),IL-6 和 TNF-α 检测试剂盒购自美国 Endogen 公司。

1.2.3 黄芪对体外 PBMC 产生 IL-6 和 TNF-α 影响的观察:选择黄芪治疗组中 10 例患儿的外周血体外 PBMC,在培养结束前 18 h 向 PBMC 中加入黄芪注射液,以便同时观察加入及未加入黄芪注射液对 PBMC 体外产生 IL-6 和 TNF-α 的影响。

1.3 统计学处理:正态分布数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用组间比较 t 检验及相关性分析;非正态分布数据用中位数(M)及范围表示,采用组间或自身配对秩和检验;率的比较采用  $\chi^2$  检验;P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪注射液治疗后对 HIE 患儿症状消失时间以及住院时间的影响(表 1):黄芪注射液治疗后患儿的异常原始反射、肌张力、意识障碍、惊厥等症状消失时间以及住院时间均较常规治疗组明显缩短(P 均 < 0.05)。

2.2 两组患儿发生器官功能障碍及合并症的比较(表 1):黄芪注射液治疗后患儿心功能损害、肾功能损害、高胆红素血症及院内感染等发生率均低于常规治疗组(P 均 < 0.05);但消化道或肺出血、高血糖等发生率与常规治疗组比较差异均无统计学意义。

2.3 血浆及 PBMC 体外产生 IL-6 和 TNF-α 水平的比较(表 2):所有 HIE 患儿治疗前血浆及 PBMC 体外产生 IL-6 和 TNF-α 水平均明显高于正常对照组(P < 0.05 或 P < 0.01);黄芪注射液治疗后 IL-6 和 TNF-α 均明显下降(P 均 < 0.01),常规治疗组治疗后血浆 IL-6 及 PBMC 体外产生的 TNF-α 反而有所升高,IL-6 升高具有统计学意义(P < 0.05)。

2.4 黄芪注射液对 HIE 患儿 PBMC 体外产生的 IL-6 和 TNF-α 能力的直接抑制作用(表 2):10 例患儿治疗前向 PBMC 体外培养液中直接加入黄芪注

表 1 两组 HIE 患儿治疗后临床症状消失时间、住院时间、器官功能障碍及合并症发生率的比较

组别	例数	异常临床症状消失时间( $\bar{x} \pm s, h$ )				住院时间 ( $\bar{x} \pm s, h$ )
		原始反射异常	肌张力异常	意识障碍	惊厥	
常规治疗组	20	65 ± 19(16)	51 ± 22(15)	55 ± 21(12)	26 ± 13(7)	287 ± 53(17)
黄芪治疗组	20	48 ± 12(15)*	34 ± 20(15)*	35 ± 12(10)*	44 ± 16(8)*	251 ± 38(17)*

  

组别	例数	器官功能损害情况[例(%)]					
		心功能损害	肾功能损害	消化道或肺出血	高胆红素血症	高血糖症	院内感染
常规治疗组	20	6(30)	8(40)	6(30)	11(55)	7(35)	8(40)
黄芪治疗组	20	0(0)*	1(5)*	2(10)	3(15)*	5(25)	1(5)*

注:与常规治疗组比较,\*P < 0.05;括号内为病例数

表 2 两种治疗方法对 HIE 患儿治疗前后血浆及 PBMC 体外产生 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平的影[M(范围)] ng/L

组别	例数	血浆 TNF- $\alpha$	血浆 IL-6	PBMC 中 TNF- $\alpha$	PBMC 中 IL-6
正常对照组	20	6.8( 6.0~ 13.3)	2.2( 0.8~ 15.4)	245.2( 6.9~ 340.5)	90.0( 1.2~1 979.3)
常规治疗组治前	20	2 833.4(409.0~7 232.7) <sup>b</sup>	67.8(24.5~216.0) <sup>b</sup>	1 580.7( 98.0~ 7 205.0) <sup>a</sup>	756.4(233.0~6 250.0) <sup>b</sup>
治后	20	2 150.6(116.0~3 692.6)	105.3(31.5~133.1) <sup>c</sup>	1 846.3( 42.3~22 262.4)	614.0( 32.9~4 924.0)
黄芪治疗组治前	20	2 922.6(499.0~7 183.2) <sup>b</sup>	77.5(24.5~216.0) <sup>b</sup>	2 234.0(782.5~ 5 537.0) <sup>b</sup>	1 077.3(148.0~2 783.0) <sup>b</sup>
治后	20	51.4( 9.7~3 876.1) <sup>d</sup>	31.2(15.9~ 64.7) <sup>d</sup>	50.9( 7.4~ 839.2) <sup>d</sup>	65.6( 7.0~ 381.0) <sup>d</sup>
黄芪体外抑制组	10			367.5( 21.4~ 787.4) <sup>e</sup>	384.0( 7.2~ 474.2) <sup>e</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与本组治前比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$ ;与黄芪治疗组同期比较,<sup>e</sup> $P < 0.05$ ;空白为无此项

射液后,其上清液 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平均明显低于治疗前未加入者( $P$  均  $< 0.05$ )。

### 3 讨论

近年来国内外研究表明,免疫系统及其功能异常,如 T 淋巴细胞亚群比例失调、免疫球蛋白水平异常以及炎症细胞因子、氧自由基损害等参与了新生儿窒息及 HIE 等脑损伤疾病的发病<sup>[9-12]</sup>。尽管如此,HIE 患儿脑损伤与免疫功能异常间的关系仍未得到完全揭示。已知 IL-6 和 TNF- $\alpha$  作为淋巴细胞等免疫活性细胞产生的活性分子,是免疫病理损伤中的重要免疫介质。TNF- $\alpha$  除能促进急性期反应蛋白产生外,还介导包括星形细胞在内的主要组织相容性复合物(MHC) I 类及 II 类抗原表达、细胞增殖、脱髓鞘病变及少胶质细胞溶解<sup>[11]</sup>。本组结果表明,HIE 患儿极期血浆及 PBMC 体外产生的 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平异常增高,黄芪注射液治疗后明显降低,二者治疗前后水平的变化与 HIE 病情平行。我们初步推测,HIE 患儿 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平增高可能作为损伤性介质在细胞损伤中起重要作用。

黄芪制剂已被广泛用于多种免疫相应性疾病的治疗,已发现的作用机制有:①对抗免疫抑制剂,激活免疫器官的免疫功能;②延长组织细胞在体内外的存活时间;③减少补体 C3 沉积<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,与常规治疗组比较,黄芪注射液治疗后,HIE 患儿异常的原始反射、肌张力、意识障碍及惊厥等症状和体征消失时间明显缩短,心功能受损、肾功能受损、高胆红素血症以及院内感染发生率均明显降低,住院时间亦明显缩短。说明黄芪注射液对于缓解 HIE 患儿脑水肿症状、降低器官功能障碍发生率及缩短病程具有较为确切的临床疗效。尽管本研究尚不能阐明黄芪注射液在 HIE 治疗中的确切机制,但从患儿高水平的血浆及 PBMC 体外产生 IL-6 和 TNF- $\alpha$  在黄芪治疗后明显降低,且 HIE 患儿的症状、体征消失时间明显缩短,说明通过改变 HIE 患儿 IL-6 和 TNF- $\alpha$  等损伤性细胞因子水平,从而缓解脑水肿等病理损伤,可能是黄芪注射液发挥作用

的重要途径之一。在 HIE 患儿 PMBC 体外培养液中加与静脉输注剂量相当的黄芪注射液,能明显抑制 IL-6 和 TNF- $\alpha$  产生,亦间接支持上述假设。

本组资料中,常规治疗组合并症较黄芪治疗组为多,可能与其住院时间较长、患者免疫功能低下、从而增加器官免疫性损伤,而导致相应合并症的发生有关。由于本研究尚未进行黄芪注射液治疗 HIE 患儿的长期随访结果,因而不能对黄芪注射液治疗 HIE 的远期效果加以评价,拟待在今后深入研究。

### 参考文献

- [1] 刘敬,秦振庭.新生儿缺氧缺血性脑病的免疫学机制[J].国外医学儿科学分册,2001,28(4):175-178.
- [2] 朱渊红,王直,蔡苑如.黄芪注射液对慢性阻塞性肺疾病患者黏附分子表达的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(2):76-78.
- [3] 周苏宁,邵伟,张文高,等.黄芪注射液抗心肌缺血/再灌注损伤的临床研究[J].中国中西医结合急救杂志,2000,7(3):198-170.
- [4] 张宏,孙建洁,徐光延,等.黄芪注射液对慢性重症疾病所致免疫功能低下防治作用的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2001,8(6):351-352.
- [5] 李瑞林,李占魁,郭亚乐.达那康对缺氧缺血性脑病新生儿血白细胞介素-6 和白细胞介素-8 的影响[J].中国当代儿科杂志,2000,2(增刊):101.
- [6] 易红.黄芪与复方丹参联用治疗新生儿缺氧缺血性脑病疗效观察[J].中华医学杂志,1998,22(6):277.
- [7] 赵燕玲,曲友直,王宗仁.黄芪对脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡及相关基因的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(6):341-343.
- [8] 韩玉昆,虞人杰,卜定芳,等.新生儿缺氧缺血性脑病临床诊断依据和分度[J].中华儿科杂志,1990,28(1):31-32.
- [9] Szafarski J, Burtrum D, Siverstein F S. Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats[J].Stroke,1995,26(6):1093-1100.
- [10] 史金阳,韩玉昆,孙桂莲,等.新生大鼠缺氧缺血性脑损伤与肿瘤坏死因子基因表达的研究[J].中华儿科杂志,1999,37(2):87-89.
- [11] 孙桂莲,韩玉昆.IL-1 和 TNF 与缺氧缺血性的脑损伤[J].国外医学儿科学分册,1997,24(1):30-33.
- [12] 张少丹,钱培德,张淑琴,等.新生儿缺氧缺血性脑病红细胞膜 ATP 酶、氧自由基变化及与脑损伤关系的研究[J].中国危重病急救医学,1997,9(6):351-353.
- [13] 曲卫敏,吴敏毓,黄勇.黄芪在玉屏风散中的免疫调节作用及量效关系[J].中药药理与临床,1995,11(15):4-6.

(收稿日期:2007-09-01 修回日期:2007-10-07)

(本文编辑:李银平)