

生地注射液对凝血酶损伤后神经元保护的实验研究

刘爱华¹, 俞晓飞¹, 汪 洋², 魏江磊¹

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021; 2. 上海复旦大学医学院解剖组胚教研室, 上海 200032)

【摘要】 目的 观察凝血酶对神经元的作用, 并筛选凝血酶损伤神经元的最低剂量, 探讨生地注射液对神经元损伤的保护作用。方法 培养胎鼠大脑皮质神经元细胞。将接种于 96 孔板的神经元培养 7 d 后分为 6 组, 每组 12 个孔, 依次加入 0(对照组)、25、50、75、100 和 150 kU/L 凝血酶, 观察凝血酶对神经元的损伤作用。将接种于 96 孔板的神经元培养 7 d 后分为 12 组, 每组 8 个孔, 设正常对照组, 其余 11 组分别加入 75 kU/L 凝血酶作用 24 h 后, 依次加入体积分数为 1%、2%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、8%、10% 的生地注射液。观察各组神经元病理形态学改变; 以四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法和乳酸脱氢酶(LDH)释放量来反映神经元数量和活性。结果 与对照组比较, 25 kU/L 凝血酶组 LDH 显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 其他组 LDH 值随凝血酶剂量增加呈增高趋势, 且 75、100 和 150 kU/L 凝血酶组与对照组比较差异有统计学意义(P 均 < 0.01)。与对照组比较, 除 25 kU/L 凝血酶组 MTT 值升高外, 其他组 MTT 值均显著下降, 且与对照组比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.01); 综合 LDH 与 MTT 值的结果, 筛选出凝血酶损伤神经元的最低剂量为 75 kU/L。在生地注射液干预实验中, 与正常对照组比较, 生地注射液各浓度组 LDH 值均降低, MTT 值均升高, 除 10% 组 MTT 值外, 其余各值间差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。光镜和电镜下观察正常对照组和生地注射液各浓度组神经元细胞形态均显示正常; 凝血酶各浓度组细胞则有不同程度损伤。结论 生地注射液能够提高凝血酶损伤后神经元存活率、抑制 LDH 释放, 从而对神经元起到保护作用。

【关键词】 生地注射液; 凝血酶; 神经元; 乳酸脱氢酶

中图分类号: R285.5; Q813.11 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2008)03-0155-04

An experimental study of protective effects of Shengdi (生地) injection on neuron injured by thrombin LIU Ai-hua¹, YU Xiao-fei¹, WANG Yang², WEI Jiang-lei¹. 1. Shu Guang Hospital Affiliated to Shanghai College of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021; 2. The Medical College of Shanghai Fu Dan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: WEI Jiang-lei (Email: weijianglei1426@yahoo.cn)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of thrombin on neuron, select the least dosage of thrombin that may injure neuron and approach the protective effect of Shengdi (生地, a herb of traditional Chinese medicine) on neuronal injury. Methods The fetus rat neurons of cerebral cortex were cultured; the cultured cells were inoculated in 96 well-plates for 7 days, then they were divided into 6 groups, each group being in 12 wells. Afterwards, the different concentrations of thrombin were added in each well in turn, that was 0 (normal group), 25, 50, 75, 100 and 150 kU/L to investigate the thrombin injuring effect on the neuron. The neurons which were cultured in 96 well-plates for 7 days were divided into 12 groups, and there were 8 wells in each group. Except for the normal group, in the other groups, 75 kU/L thrombin was added, after its action took for 24 hours, then Shengdi injection in different volume fractions which were 1%, 2%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 8%, 10% consecutively put into the well plates. After that, the morphological changes of neuron were observed. At the same time, the indexes of survival rate [methyl thiazdyl tetrazolium (MTT)] and injury [lactic dehydrogenase (LDH)] were tested to show the number and activity of the neuron. Results Compared with the normal group, the value of LDH in 25 kU/L group was decreased and showed statistical significance ($P < 0.05$), while in the other groups, it was suggested that the increase of LDH tended to follow the increase of dosage of thrombin, and there were statistical significances in 75, 100 and 150 kU/L thrombin groups (all $P < 0.01$). On the other hand, compared with the normal group, except for the 25 kU/L group in which the value of MTT was increased, in all the other groups it was decreased significantly (all $P < 0.01$). According to the results of LDH and MTT, the selected least dosage that might injure the neuron was 75 kU/L thrombin. In the experiment of intervention by Shengdi injection, compared with the normal group, the value of LDH was significantly decreased in all Shengdi groups (all $P < 0.01$), while the value of MTT was increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$, except 10% Shengdi injection

group). The nerve cells in normal group and various Shengdi groups showed normal in form, while the neurons in various thrombin groups suggested injury in various degrees under light and the electron microscopes. **Conclusion** Shengdi injection can increase the survival rate of the thrombin injured cortical neuron and inhibit the release of LDH, thus the injection has a protective effect on the neuron.

【Key words】 Shengdi injection; thrombin; neuron; lactic dehydrogenase

脑出血是神经科常见的急危重症之一,发病率、致残率、病死率均很高,目前的治疗尚缺乏有效的手段,即使及时清除血肿也不能取得满意的疗效。凝血酶不仅是凝血级联反应中的关键酶,且能与多种类型细胞反应而引起广泛的细胞生物学效应^[1]。凝血酶的神经作用机制较为复杂,低浓度时有细胞保护作用,高浓度时则有细胞毒性作用,但具体机制尚未完全阐明^[2]。有研究结果表明,凝血酶通过对脑细胞的毒性作用及血脑屏障(BBB)的破坏导致脑水肿^[3];可以诱导神经细胞凋亡,从而在继发损伤中占有重要的位置^[4];也可通过炎症反应间接造成脑细胞损害^[5];并可通过促进细胞铁的摄取而加重脑出血引起的脑损害^[6]。也有研究表明,凝血酶通过激活蛋白酶激活受体 1(PAR1)、纤溶酶原激活剂抑制剂-1(PAE-1)、热休克蛋白(HSP)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、钙转运、低氧诱导因子-1(HIF-1)等机制对中枢神经系统起到保护作用^[2]。

生地味甘、苦,性寒;归心、肝、肾经,具有清热、生津润燥、凉血止血之功效。既可养阴生津,又可清热凉血。经过我们前期的临床观察显示,生地注射液有助于降低脑出血的病死率、致残率,可减少患者的住院天数和住院费用,对改善患者生存质量,进而减轻家庭、社会负担都有重要意义^[7]。为探讨其良好的神经保护作用机制,本实验中采用脑出血后神经元损伤模型,观察生地注射液的干预作用,报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材料:SD 孕鼠由上海复旦大学医学院动物中心提供;神经元培养液 neurobasal 和 B27 及谷氨酰胺(Gln)购自美国 GBICO 公司;凝血酶购自美国 Sigma 公司;微管相关蛋白-2(MAP-2)购自美国 Santa Cruz 公司;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自南京建成公司;生地注射液由上海中医药大学附属曙光医院制剂室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 大脑皮质神经元的原代培养:选择孕

基金项目:上海市教委课题资助项目(05cz19)

通讯作者:魏江磊,Email:weijianglei1426@yahoo.cn

作者简介:刘爱华(1977-),女(蒙古族),内蒙古自治区人,博士研究生,医师,Email:huamei1977@163.com。

12~16 d 鼠的胎鼠,在无菌条件下分离其大脑皮质,置于含 D-hank 液的离心管中反复吹打,直至将细胞打散后进行离心,吸弃上层液体,加入培养液(neurobasal/B27/Gln),再将细胞吹打至分散后进行计数,将细胞密度调整至 $4.5 \times 10^8/L$,经 200 目筛网过滤后接种于 96 培养孔板中,置于 $36^\circ C$ 、含体积分数为 5% CO_2 的培养箱内进行培养,每 3 d 换 1 次培养液。

1.2.2 神经元的鉴定:将培养 7 d 后的神经元用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,再用多聚甲醛水溶液固定 15 min,采用间接免疫组化法检测 MAP-2 表达,阳性细胞即为神经元。

1.2.3 神经元损伤动物模型制备及分组:将接种于 96 孔板的神经元培养 7 d,加不同浓度的凝血酶,分为 0(对照组)、25、50、75、100 和 150 kU/L 组,每组 12 个孔,其中对照组加入 neurobasal/B27/Gln 混合液,其他各组分别加入不同浓度的凝血酶与 neurobasal/B27/Gln 混合液,每孔所加液体量均为 100 μl 。培养 24 h 后检测 LDH 和四甲基偶氮唑盐(MTT)水平,以 MTT 比色法和 LDH 释放量来反映神经元数量和活性。

1.2.4 生地注射液的干预方法:将神经元接种于 96 孔板中培养 7 d 后,将 96 孔板分为 12 组,每组 8 个孔,除正常对照组体积分数为 0 外,其他孔均加入 75 kU/L 凝血酶继续培养 24 h,并分别加入不同体积分数(1%、2%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、8%、10%)的生地注射液后继续培养 72 h,然后检测 LDH 和 MTT。

1.2.5 LDH 检测:按试剂盒说明书操作,在酶标仪上检测吸光度(A)值,并按公式计算。

$$\text{LDH 活性(U/L)} = \frac{(\text{测定管 A 值} - \text{测定空白管 A 值}) / (\text{标准管 A 值} - \text{标准空白管 A 值}) \times \text{标准管浓度} (2 \text{ mmol/L}) \times 1000 \times \text{测试前样品稀释倍数}}$$

1.2.6 MTT 检测:每孔板加 20 μl MTT 液继续培养 3~4 h,取 100 μl 培养液,加入等量含 0.04~0.10 mol/L 盐酸的异丙醇溶液,在微型振荡器上振荡 5 min,在酶标仪上测定波长 490 nm 处的 A 值。

1.2.7 神经元病理形态学观察:将细胞用体积分数为 2.5% 的戊二醛固定 2 h,于 $4^\circ C$ 冰箱储存 2 h,再

用 0.1 mol/L 二甲砷酸钠充分洗涤后,用质量分数为 1% 的锇酸溶液后固定 2 h,梯度乙醇脱水浸透,618 环氧树脂包埋、烘箱中聚合、修整,切成厚度为 50~60 nm 的切片,醋酸铀-枸橼酸铅双染色,透射电镜下观察。

1.3 统计学方法:使用 SPSS 12.0 统计分析软件。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用配对 *t* 检验或方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经元鉴定(图 1):MAP-2 抗体免疫阳性反应主要位于神经元核周和树突,镜下所见 MAP-2 免疫阳性细胞绿色染色,而轴突和神经胶质细胞无染色。

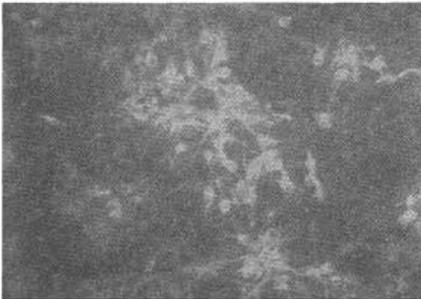


图 1 MAP-2 抗体标记的正常神经元

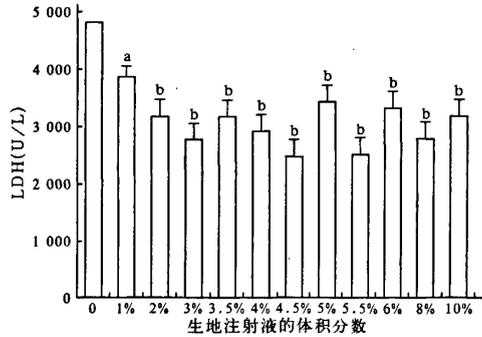
2.2 凝血酶对神经元的损伤作用(表 1):与对照组比较,25 kU/L 凝血酶组 LDH 显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),其他组 LDH 值随凝血酶剂量增加呈增高趋势,且 75、100 和 150 kU/L 凝血酶组与对照组比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。与对照组比较,除 25 kU/L 凝血酶组 MTT 值升高外,其他组 MTT 值均下降,且与对照组比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.01);综合 LDH 值与 MTT 值的结果,筛选出凝血酶损伤神经元的最小剂量为 75 kU/L。Pearson 相关性分析显示,MTT 与 LDH 呈显著负相关($r = -0.842, P = 0.036$)。

表 1 凝血酶各浓度组对 LDH 和 MTT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

凝血酶用量	LDH(U/L)	MTT(A 值)
对照组	3 158.00 ± 180.64	0.207 ± 0.041
25 kU/L 组	2 179.75 ± 211.48 ^a	0.221 ± 0.097
50 kU/L 组	3 280.92 ± 1 444.44	0.132 ± 0.022 ^b
75 kU/L 组	4 849.67 ± 1 616.45 ^b	0.130 ± 0.028 ^b
100 kU/L 组	4 664.20 ± 347.90 ^b	0.134 ± 0.028 ^b
150 kU/L 组	5 280.70 ± 722.89 ^b	0.121 ± 0.016 ^b

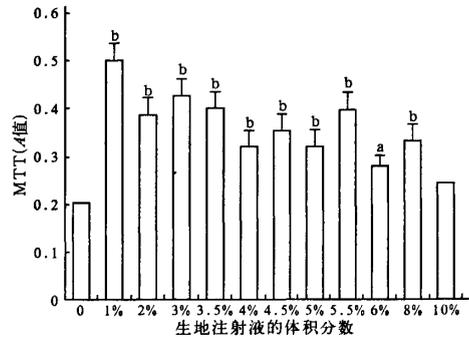
注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

2.3 生地注射液的保护作用(图 2,图 3):与正常对照组比较,随中药浓度的增加,各组 LDH 值均显著降低,MTT 均显著升高,除 10% 组 MTT 值外,其余差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

图 2 不同浓度生地注射液对 LDH 的影响



注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

图 3 不同浓度生地注射液对 MTT 的影响

2.4 病理形态学观察:①光镜下可见:正常对照组和生地注射液各浓度组神经元丰满、圆润,细胞核居中,细胞质丰富,核仁清晰,细胞结构紧密,排列整齐;凝血酶各浓度组可见少量神经元核深染,排列稍乱,并可见较多的细胞核深染,边界不清。②电镜下可见:正常对照组神经元形态正常;凝血酶各浓度组神经元体积缩小、细胞变圆、失去微绒毛、胞体皱缩、穿孔、突起断裂,核内有空泡;各浓度组神经元形态接近正常。

3 讨论

《东垣十书·溯洄集·中风辨》云:“中风者,非外来风邪,乃本气自病也,凡人年逾四旬,气衰之际,或因忧喜愤怒伤其气者多有此疾。”由于当今人多食膏粱厚味,运动减少,加之生活节奏加快,生活压力增大,高血压、糖尿病、高血脂等“富贵”病罹患人群增多,或有未病者,亦存气阴不足。名老中医王左教

授总结多年临床经验,以扶正固元之法治疗中风获得较好疗效。认为治疗中风,邪固当祛,窍亦当开,然要在知邪之所生,邪之所伤,若仅知辨邪之所在,是忽其本,但求其末。用益气养阴之法,意在扶正护脑^[8]。生地乃王左教授临证常用益气养阴佳品之一。

据研究报道,小剂量凝血酶预处理可明显减小缺血后脑梗死面积,减轻脑水肿程度,具有神经保护作用^[9]。但较高浓度的凝血酶可使神经元的轴突和树突退变,使星形胶质细胞和成神经细胞瘤细胞发生轴突回缩、细胞聚集,胶质细胞星形化受阻^[10]。本实验研究结果与上述研究相符,凝血酶小剂量时对神经元具有保护作用,大剂量则具有损伤作用。在用凝血酶对神经元损伤最小剂量(75 kU/L)模拟神经元损伤后,再予生地注射液进行干预,结果显示其具有减轻神经元损伤的作用,提高了神经元的存活率,表明对神经元具有保护作用。组织病理形态学观察也显示,除 25 kU/L 组外,其他凝血酶浓度组神经元均有损伤,而生地注射液干预后均接近正常,说明生地注射液对凝血酶导致神经元损伤的修复具有一定的作用。由于凝血酶的神经作用机制较为复杂,具体机制尚未完全阐明^[9],故对于生地注射液干预其损伤具体环节亦有待更进一步研究。

参考文献

[1] Hou L, Howells G L, Kapas S, et al. The protease-activated

receptors and their cellular expression and function in blood related cells [J]. Br J Haematol, 1998, 101(1): 1-9.

[2] 杨文琼, 孙圣刚. 凝血酶在中枢神经系统中的作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(6): 382-384.

[3] Xi G, Wagner K R, Keep R F, et al. Role of blood clot formation on early edema development after experimental intracerebral hemorrhage [J]. Stroke, 1998, 29(12): 2580-2586.

[4] Gong C, Boulis N, Qian J, et al. Intracerebral hemorrhage-induced neuronal death [J]. Neurosurgery, 2001, 48 (4): 875-882.

[5] Masada T, Hua Y, Xi G, et al. Attenuation of intracerebral hemorrhage and thrombin-induced brain edema by overexpression of interleukin-1 receptor antagonist [J]. J Neurosurg, 2001, 95(4): 680-686.

[6] Nakamura T, Xi G, Park J W, et al. Holo-transferrin and thrombin can interact to cause brain damage [J]. Stroke, 2005, 36(2): 348-352.

[7] 俞晓飞, 王左, 魏江磊. 生地注射液治疗急性脑出血临床研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(4): 32-34.

[8] 王左. 益气养阴活血法论治出血性中风 [J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(9): 1-2.

[9] Masada T, Xi G, Hua Y, et al. The effects of thrombin preconditioning on focal cerebral ischemia in rats [J]. Brain Res, 2000, 867(1-2): 173-179.

[10] Beecher K L, Andersen T T, Fenton J W 2nd, et al. Thrombin receptor peptides induce shape changes in neonatal murine astrocytes in culture [J]. J Neurosci Res, 1994, 37(1): 108-115.

(收稿日期: 2008-03-24 修回日期: 2008-05-10)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

如何紧急诊治休克

赵晓东¹, 马俊勋¹, 沈洪²

(1. 解放军总医院一附院急救部, 北京 100037; 2. 解放军总医院急诊科, 北京 100852)

1 伤员发生休克的原因

休克可分为失血性休克、心源性休克、神经源性休克等。灾区伤员发生的休克大部分是低血容量性休克和神经源性休克, 少部分为挤压后发生的感染中毒性休克和心源性休克。低血容量性休克多由大血管破裂、肝脾破裂、骨折等所致。神经源性休克系外伤、骨折、剧烈疼痛、精神创伤等所致。心源性休克主要因张力性气胸、心肌挫伤、心包填塞所致。

2 如何判断休克

创伤性休克的诊断标准为: ①周围循环灌注不足表现: 意识障碍; 脉细数, 脉搏 > 100 次/min 或不能触知; 四肢湿冷; 皮肤出现花纹, 黏膜苍白或发绀。②尿量 < 30 ml/h 或无尿。③收缩压 < 80 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 脉压差 < 20 mm Hg。原有高血压者, 收缩压较原水平下降 30% 以上。

3 紧急救治要点

3.1 有效止血、止痛、包扎: 自救者可以用身边的材料就地止血, 救护人员一般用敷料加压包扎止血。对于动脉出血或肢体离断则要用止血带进行有效止血, 同时止痛, 以减少神经源性休克。

3.2 建立有效的静脉通路和补液: 可先迅速输注生理盐水或平衡盐溶液 1 000~2 000 ml。若血压回升并能维持, 表明出血量已减少或已停止出血。但对于难以用一般措施控制的出血, 应在补充血容量的同时手术止血。

3.3 保持呼吸道畅通: 迅速清除伤员口腔及呼吸道内的分泌物及异物; 遇有喉头水肿或昏迷患者舌后坠时, 可用舌钳将舌头夹出; 必要时立即进行气管插管和吸氧。

3.4 改善微循环: 应用扩充血容量和血管活性药物, 以调节血管舒缩功能, 纠正酸碱及水、电解质平衡紊乱, 这是抢救休克的关键。

3.5 迅速转院: 在对严重的休克伤员实施以上现场急救后, 应迅速将其转送到有手术能力的医院继续救治, 以尽最大力量挽救伤员的生命。

[摘自《健康报》2008-05-20(8)]