

青蒿素对脑缺血 / 再灌注损伤大鼠 肿瘤坏死因子- α 表达的影响

罗悦晨¹, 梁林^{2a}, 臧照辉^{2b}, 董化江^{2c}, 杨德慧^{2c}, 李伯森^{2c}, 单云官^{2c}

(1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2. 武警后勤学院 ①科研部, ②研究生处, ③人体解剖学教研室, 民政部 101 研究所遗体防腐整容重点实验室, 天津 300162)

【摘要】目的 探讨青蒿素对脑缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的影响。**方法** 将 40 只 Wistar 大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组及青蒿素低、中、高浓度组, 每组 8 只。采用大脑中动脉闭塞法 (MCAO) 复制局灶性脑 I/R 损伤大鼠模型。制模成功后, 假手术组和模型组均灌胃 30 ml 生理盐水, 青蒿素低、中、高浓度组分别由腹腔注射青蒿素 200、300、400 mg/kg, 均每日 1 次, 连续 60 d。采用放射免疫法 (RIA) 检测血清 TNF- α 含量, 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 和蛋白质免疫印迹法 (Western blotting) 检测关节软骨组织 TNF- α mRNA 和蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组和青蒿素各浓度组血清 TNF- α 含量和组织 TNF- α mRNA 及蛋白表达均明显升高; 与模型组比较, 青蒿素各浓度组血清 TNF- α 含量及组织 TNF- α mRNA 和蛋白表达均明显下降 (均 $P < 0.05$), 以青蒿素高浓度组下降更显著 [血清 TNF- α ($\mu\text{g/L}$): 51.9 ± 9.4 比 88.3 ± 9.7 , TNF- α mRNA: 0.20 ± 0.14 比 0.77 ± 0.31 , TNF- α 蛋白: 0.19 ± 0.08 比 0.76 ± 0.09 , 均 $P < 0.05$]。**结论** 青蒿素可降低脑 I/R 损伤大鼠 TNF- α 的表达, 有效控制炎症反应进程。

【关键词】 青蒿; 缺血 / 再灌注损伤; 脑; 肿瘤坏死因子- α ; 大鼠

The effect of Artemisia annua on expression of tumor necrosis factor- α in rats with acute cerebral ischemia/reperfusion injury LUO Yue-chen*, LIANG Lin, ZANG Zhao-hui, DONG Hua-jiang, YANG De-hui, LI Bo-sen, SHAN Yun-guan. *Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Corresponding author: LIANG Lin, Department of Scientific Research, Anatomy Department, Logistics College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China, Email: cforest@sina.com

【Abstract】Objective To detect the effect of Artemisia annua on tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rats with acute cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** Forty Wistar rats were randomized into sham operation group, model group, Artemisia annua high-, middle- and low-dose groups, each $n=8$. The model of focal cerebral I/R injury was reproduced by middle cerebral artery occlusion (MCAO). In the sham operation group and model group, 30 ml normal saline was administered intra-gastrically, while in Artemisia annua low-, middle- and high-dose groups, 200, 300 and 400 mg/kg Artemisia annua were intra-peritoneally injected, respectively, once a day for consecutive 60 days in all the groups. The serum content of TNF- α was detected by radioimmunoassay, and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting methods were used to determine the expressions of tissue TNF- α mRNA and protein. **Results** Compared with the sham operation group, the concentration of TNF- α in serum, and the expressions of tissue TNF- α mRNA and protein in model group and various Artemisia annua groups were significantly increased; compared with the model group, the concentration of TNF- α in serum, and the expressions of tissue TNF- α mRNA and protein in various Artemisia annua groups were significantly decreased (all $P < 0.05$), the greatest descent being in the high-dose group [TNF- α in serum ($\mu\text{g/L}$): 51.9 ± 9.4 vs. 88.3 ± 9.7 , TNF- α mRNA: 0.20 ± 0.14 vs. 0.77 ± 0.31 , TNF- α protein: 0.19 ± 0.08 vs. 0.76 ± 0.09 , all $P < 0.05$]. **Conclusion** Artemisia annua can down-regulate the expression of TNF- α and effectively inhibit the process of inflammation in rates with acute cerebral I/R injury.

【Key words】 Artemisia annua; Cerebral ischemia/reperfusion injury; Tumor necrosis factor- α ; Rat

缺血性脑血管病是我国人群的高发病, 致死、致残率高, 临床治疗主要原则是恢复血流再通, 挽救濒死的细胞。但在血流恢复抢救受损细胞的同时, 也会因为缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤加重细胞损伤与死亡, 因此, 寻找新的 I/R 损伤的治疗靶点和途径尤为迫切^[1-2]。研究表明, 左旋精氨酸和依达拉奉对 I/R

损伤脑有保护作用^[2]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL-1、IL-6) 等在脑 I/R 损伤发生发展的病理进程中起重要作用^[3]。青蒿具有解暑热、截疟、退黄、抗炎等作用, 其中所含有的青蒿素类药物对 T、B 淋巴细胞等多种免疫细胞均具有免疫调节及限制炎症扩大的作用^[4]。本研究中探讨青蒿素对急性脑 I/R 损伤大鼠模型 TNF- α 的影响及意义。

1 材料与方法

1.1 动物分组、模型复制及给药方法: SPF 级成年健

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2013.01.009

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划 (2007BAK38B05); 武警医学院种子基金项目 (FYM201210)

通信作者: 梁林, Email: cforest@sina.com

康 Wistar 大鼠 40 只,雌雄不限,体质量 244~255 g,平均 248 g,由解放军总医院实验动物中心提供,动物合格证号:SCGK(京)2011-0418。按随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组及青蒿素低、中、高浓度组,每组 8 只。采用大脑中动脉闭塞法(MCAO)复制局灶性脑 I/R 损伤大鼠模型^[4]。模型组腹腔注射 0.4%戊巴比妥钠 0.02 ml/g 麻醉大鼠,从颈正中处切开皮肤,分离单侧颈外动脉、颈内动脉主干至分叉处,用动脉夹夹闭颈总动脉和颈内动脉分叉,结扎颈外动脉,在颈外动脉远端结扎处剪口,插入尼龙线栓子至颈内动脉分叉,缺血 20 min 后将尼龙线拔出再灌注 1 h;假手术组仅穿线不结扎。青蒿素低、中、高浓度组分别于制模成功后由腹腔注射青蒿素(由中国药品生物制品鉴定所提供,批号:110729-200310)200、300、400 mg/kg;假手术组、模型组灌胃 30 ml 生理盐水,均每日 1 次,连续 60 d。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 血清 TNF- α 含量测定:将大鼠开胸由右心房取血,低温分离血清,采用放射免疫法(RIA)检测 TNF- α 含量,试剂盒由上海雅吉生物科技有限公司提供,操作严格按试剂盒说明书进行。

1.2.2 组织 TNF- α mRNA 和蛋白表达测定:取各组大鼠关节软骨组织,用 TRIzol 法提取组织总 RNA,紫外分光光度计检测样品吸光度(A)值,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TNF- α mRNA 表达;采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 TNF- α 蛋白表达。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析和 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 TNF- α 含量比较(表 1):与假手术组比较,模型组及青蒿素各浓度组 TNF- α 含量均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与模型组比较,青蒿素各浓度组 TNF- α 表达均明显下降,以青蒿素高浓度组下降更显著,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。

2.2 各组 TNF- α mRNA 及蛋白表达比较(表 1):与假手术组比较,模型组及青蒿素各浓度组组织 TNF- α mRNA 及蛋白表达明显升高(均 $P<0.05$);与模型组比较,青蒿素各浓度组 TNF- α mRNA 及蛋白表达均明显下降,以青蒿素高浓度组下降更显著(均 $P<0.05$)。

表 1 各组大鼠血清 TNF- α 含量及组织 TNF- α 的 mRNA 和蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	血清 TNF- α ($\mu\text{g/L}$)	组织 TNF- α mRNA	组织 TNF- α 蛋白
假手术组	8	29.1 $\pm$ 11.1	0.09 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02
模型组	8	88.3 $\pm$ 9.7 ^a	0.77 $\pm$ 0.31 ^a	0.76 $\pm$ 0.09 ^a
青蒿素低浓度组	8	71.6 $\pm$ 6.8 ^{ab}	0.51 $\pm$ 0.19 ^{ab}	0.48 $\pm$ 0.18 ^{ab}
青蒿素中浓度组	8	58.8 $\pm$ 10.7 ^{abc}	0.39 $\pm$ 0.20 ^{ab}	0.36 $\pm$ 0.10 ^{abc}
青蒿素高浓度组	8	51.9 $\pm$ 9.4 ^{abcd}	0.20 $\pm$ 0.14 ^{abcd}	0.19 $\pm$ 0.08 ^{abcd}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与青蒿素低浓度组比较,^c $P<0.05$;与青蒿素中浓度组比较,^d $P<0.05$

3 讨论

脑血管疾病目前成为人类健康的主要杀手,药物治疗是救治脑血管疾病的主要方法,研究抗缺血性脑血管疾病的药物已成为当务之急。研究表明,脑缺血后大部分的血管能自然再通,溶栓治疗后血流也可恢复再通,恢复的血液灌流终止了缺血损伤的过程,并至少使部分可逆的损伤组织功能得到恢复^[1]。但血流恢复后可以造成部分受损的脑细胞继续死亡,即发生 I/R 损伤^[2]。临床上常见的是局部或区域性脑缺血,MCAO 法制备的动物模型类似临床脑卒中情况。研究已表明,MCAO 后急性期大鼠脑梗死范围最大,大鼠神经行为缺失症状严重,且伴有严重的脑水肿。TNF- α 是炎症早期最具影响的介质之一,不但可以通过促使炎症介质释放和诱导 IL-1、IL-6 等其他炎症因子产生造成炎症损伤的级联放大效应,还可通过一系列的病理生理过程向炎症部位迁移,启动炎症反应的发生,参与关节炎发生发展的病理进程^[3-4]。

中药青蒿味苦、性寒,入肝经,具有清虚热、除骨蒸、解暑热、截疟、退黄之功效^[5-6]。青蒿中所含的青蒿素有效成分双氢青蒿素可以合成青蒿琥酯和蒿甲醚两种衍生物^[5-6]。双氢青蒿素除具有抗疟、抗血管增生、抗炎、抗肿瘤等作用外,还具有广泛的免疫调节作用^[6]。本实验中利用 MCAO 模型阐明青蒿素对 TNF- α 的抑制作用,探讨青蒿素对脑 I/R 损伤发展的抑制作用。结果证实,青蒿素可明显降低脑 I/R 损伤大鼠 TNF- α 的表达,有效限制炎症的级联放大效应和炎症发展的病理生理进程,起到保护脑组织的作用。因此,可通过青蒿素对 TNF- α 进行干预,减慢脑 I/R 损伤的发展速度。有关青蒿素的临床应用仍需进一步进行临床前的分子机制研究。

参考文献

- [1] 付江泉,王迪芬,刘辉,等.神经生长因子和依达拉奉对缺血/再灌注损伤脑保护作用的比较研究.中国危重病急救医

- 学, 2010, 22 (4): 226-229.
- [2] 董化江, 单娜娜, 罗悦晨, 等. 左旋精氨酸对急性心肌缺血/再灌注损伤大鼠内皮素-1 的影响. 中国危重病急救医学, 2011, 23 (12): 731-733.
- [3] 杨俊玲, 尹金植, 李青山, 等. 实验性肺纤维化小鼠 IL-1 和 TNF- α 的动态表达及其意义. 吉林大学学报 (医学版), 2007, 33 (3): 522-525.
- [4] Wang JX, Tang W, Shi LP, et al. Investigation of the

immunosuppressive activity of artemether on T-cell activation and proliferation. Br J Pharmacol, 2007, 150 (5): 652-661.

- [5] 李建生, 刘敬霞, 于海滨, 等. 大鼠自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉制备脑缺血模型的建立与评价. 中国危重病急救医学, 2006, 18 (5): 272-274.
- [6] 屠呦呦. 青蒿及青蒿素类药物. 北京: 化学工业出版社, 2009: 1-100.

(收稿日期: 2012-11-02) (本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

改良电凝刀头微创治疗大隐静脉曲张 191 例

张绍华, 刘清浩

(河北省东光县医院外科, 河北 沧州 061600)

本院 2007 年 6 月至 2011 年 12 月使用自行改良的电凝刀头电凝曲张的浅表静脉加用改良的小切口大隐静脉主干全程剥脱手术方法治疗大隐静脉曲张患者 191 例, 效果较好, 报告如下。

1 临床资料

1.1 一般情况: 191 例患者中男性 142 例, 女性 49 例; 年龄 30~70 岁。左侧大隐静脉曲张 77 例, 右侧 63 例, 双侧 51 例, 共 242 条患肢。术前均行下肢深静脉通畅试验及彩色多普勒超声检查, 诊断为单纯性下肢静脉曲张, 无深静脉瓣膜功能不全。

本研究符合医学伦理学标准, 并经医院伦理委员会批准, 所有治疗方法均取得患者或家属的知情同意。

1.2 电凝刀头的改良: 一般电凝治疗使用塑料套管针, 其缺点是塑料套管在电凝时易遇热软化或融化, 另外塑料套管针与电极柄的连接不很牢靠, 以上缺点使手术操作不方便, 易使皮肤灼伤。改良的电凝刀头材质采用直径为 1.0 mm 碳钢条, 长约 6~8 cm, 留 2 cm 尾端与刀柄连接, 余部磨细相当于 7~9 号针头粗细, 表面涂以不黏的绝缘层, 留针尖部 3~4 mm 不加涂层。优点是电刀头与电极手柄接触紧密导电性好, 加不黏涂层后既绝缘, 又隔热, 表面光滑便于操控。

1.3 手术方法: 硬膜外麻醉 (或腰麻) 后取平卧位, 腹股沟皮纹下方股动脉内侧行 1 cm 左右横切口, 解剖分离出大隐静脉主干, 结扎但暂不切断。内踝前内侧行 0.5~0.8 cm 横切口, 游离出大隐静脉, 远端结扎后向近心端插入一次性抽剥器至腹股沟部, 再次确认结扎血管为大隐静脉主干后双重结扎大隐静脉主干后切断。引出剥脱器头端后暂不进行大隐静脉剥脱, 此时先用改良的电凝刀对标记的所有曲张浅静脉逐一穿刺电凝, 包括没有标记过的微细的蜘蛛状曲张静脉。电凝完毕顺行全程剥脱大隐静脉, 如果有剥脱不全可再逆行剥脱 1 次, 如还有剥脱不全可加剥离子后再顺剥 1 次, 如此反复至完全剥脱。对于静脉曲张较重成团块状者抽剥器不能一次自踝部贯穿至腹股部, 可在受阻部位加做一个 1.0 cm 切口, 分两段来完成全程抽剥。大隐静脉主干全程抽剥完毕用敷料覆盖后, 弹力绷带自足踝部向上加压包扎直至腹股沟处切口下缘, 结束手术。

1.4 结果: 所有病例均于次日开始下床活动, 每个刀口缝合 1 针, 每条患肢最多缝合 3 针, 均一期拆线, 无一例感染。术后 2 d 更换敷料时可见所有曲张浅表静脉及蜘蛛状曲张小静脉经电凝后硬化干瘪。有近 1/3 的患者在大隐静脉主干走行方向出现大小不等的瘀斑, 日后可自行吸收消退无需特殊处理。有 7 例患者出现点状散在小面积皮肤灼伤, 经换药处理短时间内自行愈合。有 1 例患者由于出院后长时间蹲坐, 术后半个月出现小腿深静脉血栓, 经及时治疗好转。术后随访 3 个月至 3 年, 近期及远期疗效均满意, 除前述 1 例外无深静脉血栓形成发生, 无浅表静脉曲张复发。对于有血栓的静脉团块适度电凝不用刻意手术剥除, 3~6 个月内可完全激化吸收。有皮肤溃疡的会逐渐愈合, 营养不良状况也会逐渐改善。

2 讨论

大隐静脉曲张的治疗有多种方法, 如硬化剂注射、环形缝扎、激光治疗、射频消融、透光旋切等, 但目前手术治疗仍是主要的方法。传统手术方法为高位结扎大隐静脉主干及属肢全程剥脱大隐静脉主干, 分段切除浅表曲张静脉, 效果肯定。但由于手术切口过多、过长, 创伤较大, 术后恢复慢。

硬化剂注射短期内静脉曲张会消失, 但由于没有高位阻断主干静脉和交通静脉的逆流, 会有较高的复发率, 并有发生深静脉血栓形成和肺栓塞等严重并发症的可能。激光、射频消融及刨吸所需设备价格昂贵, 并有一定的复发率和并发症的发生。

传统的手术方法是高位结扎大隐静脉主干及 5 个分支。本方法是在高位游离大隐静脉时遇到几个分支即结扎几个分支, 但对于扩张增粗的分支一定要结扎。本组患者中只有 1 例患者 1 个分支也没有找到, 一般都能找到 2~3 支以上。对于肥胖及分支静脉扩张的患者, 高位结扎大隐静脉后的顺行插入剥脱器就是辨认大隐静脉的方法之一。电凝时注意高频电刀的电凝强度选择不要过大, 电凝时间的掌握以电凝时一手食指轻触电刀尖端相对应的部位, 如能感到指尖下的轻微振动放电感为最佳, 触不到放电振动感时以电凝 3~5 s 为宜。在标记的浅表静脉部位多点进行电凝, 包括静脉腔内、静脉壁及周围组织。

(收稿日期: 2012-10-16)

(本文编辑: 李银平)