

• 实验研究 •

补阳还五汤对实验性脑水肿氧自由基
与细胞超微结构变化的影响*

广东省佛山市中医院(佛山 528000) 谭 峰

湖南省中医学院 欧正武 李安国 李 晖

湖南省医科大学 贺石林 虞佩兰 张宝林 彭隆祥 文亚连

内容提要 观察补阳还五汤对百日咳菌液致大鼠急性脑水肿(BE)时氧自由基(O_2^-)有关参数与脑细胞超微结构的影响。结果表明:补阳还五汤可明显减少BE时鼠脑蛋白、丙二醛含量,使降低的脑组织超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性增高,轻度减轻左侧大脑皮质脑毛细血管周围星形胶质细胞突与神经元内线粒体水肿,显著减少左侧脑毛细血管内皮细胞内吞饮小泡的转运,右侧脑含水量亦较对照组显著减少($P < 0.05$)。提示:补阳还五汤有明显减轻BE时 O_2^- 连锁反应对血脑屏障与脑细胞的损害作用。

关键词 补阳还五汤 脑水肿 氧自由基 细胞超微结构

脑水肿的发病机制和临床防治迄今仍是医学领域亟待解决的问题^(1,2)。近期的一些研究表明,BE的发生不仅与脑微循环障碍、细胞泵功能衰竭,钙反常相关,而且氧自由基(O_2^-)引发和增殖的脂质过氧化连锁反应亦是BE的重要成因。补阳还五汤已广泛用于治疗缺血性脑血管疾病,但其对 O_2^- 与BE的影响,目前报道甚少。本文观察百日咳菌液(PV)致大鼠急性脑水肿时脑组织丙二醛(MDA)、水分、蛋白含量、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性,细胞超微结构等变化,以及静脉注射补阳还五汤对其影响。旨在从分子和亚细胞水平探讨补阳还五汤对脑细胞和血脑屏障(BBB)的保护效应及机理,以求为补阳还五汤的临床应用提供一定的实验依据。

材料与方 法

一、主要试剂与药物 四乙氧基丙烷、考马斯亮蓝G250;Fluka产;SOD、二硝基苯甲酸(DTNB);Sigma产;连苯三酚:遵义市第二化工厂产;谷胱甘肽:上海酵母厂产;百日咳菌液(PV):北京生物制品研究所产,含菌量 1760 亿/ml,批号84-48J;补阳还五汤:湖南中医学院特制,含复方生药 5 g/ml,pH为 7.0 , $E_{\max t/2}$ 约为 34 min,小鼠 LD_{50} 为 149.0 g/kg。

二、动物分组与处理 见表1。SD健康雄性大鼠(湖南医科大学动物室提供)48只,体重 $250 \sim 450$ g,月龄 $4 \sim 6$ 个月。按照随机分组法设计分为I~IV组,每组12只。各组均分别于实验即时、10、70、130、190min各注射1次。依次为:I组(空白组),NS 5次;II组(对照组):NS、PV、NS、NS、NS;III组(预防组):补阳还五汤、PV、NS、NS、NS;IV组(防治组)补阳还五汤、PV、补阳还五汤、补阳还五汤、补阳还五汤。给药方法:根据虞佩兰等制作家兔脑水肿模型的方法加以改进⁽³⁾,于60s内从阴茎静脉匀速注入补阳还五汤或NS 0.2 ml/100g,10min后夹闭左颈外、枕、翼腭动脉,向左颈总动脉内顺血流方向20s内匀速注入PV或NS 0.05 ml/100g,注菌后1、2、3h依次从阴茎静脉注入补阳还五汤或NS 0.1 ml/100g,同时记录注菌后15、30、60、120、240min大鼠的肛温、呼吸、心率、痛觉、抽搐、翻正反射变化。注菌后4h将鼠断头处死,在冰垫上迅速开颅,去颅骨及硬膜;肉眼观察大脑左、右半球充血、肿胀情况,用滤纸吸去表面血液,经纵裂均切为左、右两半球,再经冠状正中线切开,分为左、右、前、后四部分,左、右后部脑组织供脑含水量测定,左、右前部脑组织供其他指标测定。

三、检测指标与方法 脑含水量按Gotoh法稍改进(两次脑干重量差 ≤ 0.1 mg)⁽⁴⁾,依Elliott公式计算脑含水量⁽⁵⁾;脑蛋白测定用孙氏法⁽⁶⁾;脑MDA采用TAB

* 本课题属国家自然科学基金资助项目

法^[10], SOD用联苯三酚自氧化速率法^[11], GSH-PX用DTNB法^[12]。电镜标本每组随机取鼠3只,在冰垫上取左侧大脑正中冠状面皮质 $1 \times 1 \times 2 \text{ mm}^3$ 的脑组织块,置2.5%戊二醛固定液(4°C)中过夜,再用1% OsO_4 后固定,常规脱水、包埋、超薄切片,醋酸铅-铀双染色,日立H-600型透射电镜观察。

四、统计学方法 所有资料用 $\bar{x} \pm S$ 表示,多组间均数比较用单因素方差分析,多组间均数两两比较用Q检验,两组间左、右半球均数比较用配对t检验。

结 果

一、脑组织水、蛋白含量 (1)脑组织含水量:注入PV(II~IV)后左、右大脑半球脑组织平均含水量皆较I组同部位显著增加;III组脑含水量虽较II组减少,但 $P > 0.05$;IV组右侧脑含水量较II组明显减少, $P < 0.05$,见附表。(2)脑组织蛋白质含量:II~IV组脑蛋白平均含量均较I组显著增加,且左侧均较右侧明显升高;III、IV组脑蛋白含量均较II组明显减少,见附表。

二、脑组织MDA含量 II~IV组左侧脑组织MDA含量较I组左侧明显增高;III组左侧脑MDA含量较II组明显减低,但右侧差异无显著性意义;IV组左、右侧脑组织MDA含量均较II组同一部位明显减低,见附表。

三、脑组织SOD、GSH-PX活性 II~IV组脑组织SOD、GSH-PX活性均较I组显著减低,左侧均较右侧降低显著;III、IV组左、右侧脑组织SOD、GSH-PX活性则非常明显地高于II组相应部位,见附表。

四、细胞超微结构

1. 脑毛细血管和星形胶质细胞突 I组脑毛细血管星形胶质细胞突形态无异常改变,线粒体结构清晰,毛细血管内皮细胞内未见吞饮小泡,基底膜完整;II组脑毛细血管内皮细胞内吞饮小泡明显增多,线粒体透亮度增加,嵴膜模糊,呈絮状或消失,毛细血管周围的星形胶质细胞突透亮度明显增加,呈大空泡样改变或“水泡”样;III组脑毛细血管内皮细胞内吞饮小泡减少,部分线粒体嵴膜呈絮状,毛细血管周围的星形胶质细胞透亮度虽增加,但较II组稍轻,仍有空泡样改变;IV组鼠脑星形胶质细胞透亮度增加,毛细血管内皮细胞内仅见极少量吞饮小泡,线粒体透亮度增加,但程度均较II、III组减轻。II~IV组鼠脑星形胶质细胞胞体透亮度皆增加,I~IV组鼠脑毛细血管内皮细胞间的紧密连接和毛细血管基底膜形态均无异常改变。

2. 大脑皮质神经元 I组鼠脑皮质的神经元突

触正常,神经元内线粒体丰富,核膜完整;II组脑皮质的神经元内线粒体嵴膜模糊或消失,部分线粒体透亮度增加,呈空泡样改变,神经元的胞浆、胞核内均有空泡形成,但核膜仍完整;III组鼠脑皮质的神经元内少数线粒体透亮度增加,嵴膜消失,核糖颗粒减少,核膜完整;IV组神经元内个别线粒体透亮度增加,核糖颗粒减少,核膜完整,神经纤维正常。

讨 论

一、本模型的特点 本实验夹闭大鼠左颈外、枕、翼腭动脉,向左颈总动脉内注射PV后,左侧脑含水量明显增高,脑毛细血管周围星形胶质细胞突和神经元内线粒体水肿,证明BE模型已建立,属血管源性兼细胞毒性的急性混合性BE。此为BE发病机制与临床防治的研究提供了一种新的实验方法。本文采用简便、灵敏、快速的考马斯亮蓝法测定脑蛋白含量,结果注射PV后脑组织蛋白与水含量的增加呈正相关($y = 76.91 + 0.06x$, $r = 0.9343$),说明BBB受损后通透性增高,提示脑蛋白定量测定亦是反映BBB受损程度的一项重要指标。

二、对 O_2^- 和BE的影响 本实验表明,PV致大鼠BE时脑组织水、蛋白、MDA含量增高,SOD、GSH-PX活性减低,电镜观察结果也提示 O_2^- 参与PV致大鼠BE和脑损害过程;补阳还五汤可减轻BBB和脑细胞的受损,降低毛细血管通透性,稳定细胞膜,减少血浆成分的渗出,其机理可能与保护抗氧化酶活性、清除 O_2^- 、抑制 O_2^- 介导的脂质过氧化连锁反应等相关。此为补阳还五汤的临床应用赋予新的内涵。补阳还五汤对内皮细胞内吞饮小泡转运的影响,是否与抗 O_2^- 、改变内皮细胞转运渠道或表面电荷等有关^[13],值得深入探讨。补阳还五汤对PV致大鼠BE左侧脑含水量减少不显著,此可能为左侧BE较右侧严重所致。 O_2^- 只是导致BE的一个方面,单用 O_2^- 拮抗剂只能影响某些病理环节,对重症BE仅用补阳还五汤恐难奏效,必需联合治疗,如提高 PaO_2 、抗休克、降低ICP等。此与临床采取综合措施抢救重度BE或脑疝的机制是一致的。但注射PV前后均用补阳还五汤组右侧脑含水量较对照组明显减少($P < 0.05$),表明补阳还五汤对早期和轻型BE的防治颇有裨益。本文采用静脉注射补阳还五汤法较口服法吸收快,干扰因素少,药物可准确、迅速地达到有效血浆浓度而发挥急救作用。参照补阳还五汤的 E_{max} t/2分次注射药物的疗效优于一次给药的结果,说明按t/2规律给药,可提高血药稳态浓度,发挥中药的最佳生物效应。

附表 各组脑组织水、蛋白、MDA含量及SOD、GSH-PX活性比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	水(%)		蛋白(mg/g·ww)		MDA(nmol/mg·pr)		SOD(U/mg·pr)		GSH-PX(U/mg·pr)	
	左	右	左	右	左	右	左	右	左	右
I	78.97 ±0.49	79.06 ±0.68	58.75 ±8.80	54.41 ±5.80	4.83 ±0.55	4.99 ±0.60	5.95 ±1.64	6.23 ±1.83	95.04 ±15.94	95.30 ±20.38
II	82.77 *** ±0.99	80.95 ** ±0.69	119.07 *** ±16.60	87.37 ** ±10.80	8.42 *** ±0.94	7.21 ** ±1.05	1.47 *** ±0.49	2.58 ** ±0.59	24.57 *** ±8.38	35.39 ** ±9.88
III	82.68 * ±0.78	80.68 * ±0.73	99.01 *** ±10.90	72.85 *** ±13.00	7.94 *** ±0.84	6.55 * ±1.16	2.64 *** ±0.44	3.40 *** ±0.65	42.94 *** ±11.54	56.20 *** ±8.49
IV	82.38 *** ±0.95	80.00 △ ±0.98	86.04 *** ±10.60	66.74 *** ±9.20	6.24 *** ±0.96	5.60 * ±0.51	4.00 *** ±0.58	4.66 *** ±0.75	66.98 *** ±4.59	74.29 *** ±7.52

注: 与I组同一部位比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与II组同一部位比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与同一组右侧比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 各组样本数均为12个

参 考 文 献

1. Johansson BB. Brain Eedema. Acta Neurochirurgica Suppl 1986; 36:137.
2. Klatzo I. Pathophysiological aspects of brain edema. Acta Neuropathologica 1987; 72(3):236.
3. Rehnerona S. Molecular mechanisms for ischemic brain edema and aspects on protection. Acta Neurochirurgica Suppl 1986; 36:125.
4. Mocord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Eng J Med 1985; 312(2):159.
5. Chan PH, et al. Protective effects of liposome-entrapped superoxide dismutase on posttraumatic brain edema. Ann Neurol 1987; 21(6):540.
6. 虞佩兰, 等. 伤寒内毒素导致兔脑水肿模型. 湖南医学院学报 1983; 8(4):353.
7. Gotoho, et al. Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. Stroke 1985; 16:101.
8. Elliot KAC, et al. Measurement of experimentally induced brain swelling and shrinkage. Am J Physiology 1949; 157:122.
9. 孙爱励, 等. 一种快速、灵敏、微量的考马斯亮蓝蛋白测定法. 河北医学 1985; (7):134.
10. 陈顺志. 过氧化脂质TBA显色的三种方法学比较. 临床检验杂志 1984; 2(4):8.
11. 谢卫东, 等. 连苯三酚自氧化速率测定的改进. 医药工业 1988; 19(5):217.
12. 中国医学科学院克山病防治研究小分队. 全血谷胱甘肽过氧化物酶测定方法. 营养学报 1977; (4):229.
13. Cervos-Navarro I, et al. Brain Edema. New York, Raven Press, 1980:323-340.

• 消 息 •

上海设立“邝安堃中西医结合奖励基金”

本刊名誉总编、上海第二医科大学邝安堃教授, 从事医学教育、临床和科研工作60余年。邝安堃教授为促进上海市医学卫生事业的发展, 慷慨捐赠人民币20万元, 分别设立上海市医学卫生发展基金会“邝安堃中西医结合奖励基金”、上海第二医科大学“邝安堃奖学金”。同时, 上海市医学卫生发展基金会聘请邝安堃教授为该会顾问。有关部门及领导为其举行授聘和捐赠仪式, 高度赞扬了邝安堃教授支持发展卫生事业的崇高风尚。

amplitude of blood PGE_2 /urine PGE_2 and increased amplitude of blood $\text{PGF}_{2\alpha}$ /urine $\text{PGF}_{2\alpha}$ ratio showed as following: Spleen-Stomach Deficiency Syndrome > incoordination between Liver and stomach Syndrome > Dampness-Heat in Spleen-Stomach Syndrome. This study suggested: (1) There was a close relation between PGE_2 and chronic gastritis and peptic ulcer; (2) There was no correlation between blood PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ and urine PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$; (3) PG was possibly a useful objective parameter to the Syndrome Differentiation in TCM.

Key words chronic gastritis, peptic ulcer, prostaglandin E_2 (PGE_2), prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$)
(Original article on page 535)

The Effects of Buyang Huanwu Decoction (补阳还五汤) on Change of Oxygen Free Radical and Cell Ultrastructure in Rats with Experimental Brain Edema

Tan Feng (谭峰), et al

TCM Hospital of Foshan, Guangdong(528000)

Effects of Buyang Huanwu decoction (BYHWD) on the change of oxygen free radical and cell ultrastructure were observed in rats with acute brain edema induced by pertussis vaccine (PV). The results showed that BYHWD could decrease significantly the contents of brain tissue protein and malondialdehyde, and raise the declining of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities. Also, BYHWD could reduce markedly the transport of pinosome in the left cerebral capillary endothelial cell, and lessen slightly the swelling of cerebral perivascular astrocyte processes and mitochondria in neuron. There was no significant reduction of water content in the left hemisphere on intravenous administration of BYHWD before and after injecting PV; while that in the right hemisphere, it was less remarkable in BYHWD group than that in control ($P < 0.05$). Hence, it suggests that BYHWD had the evident effects in antagonizing the damage of blood brain barrier and encephalic cell caused by free radical in brain edema.

Key words Buyang Huanwu decoction, brain edema, free radical, cell ultrastructure.
(Original article on page 538)

Experimental and Clinical Research of Dachengqi Decoction (大承气汤) in Treating Post-traumatic RDS

Liu Fu-cheng (刘福成), Xue Fang*(薛芳), Cui Zhi-yong*(崔志永), et al

Hebei Provincial Hospital, Shijiazhuang (050051)

**Hebei College of TCM, Shijiazhuang*

12 cases of post-traumatic RDS treated with Dachengqi Decoction were reported. Results: 10 patients survived, which showed a bright prospect for the treatment of post-traumatic RDS. In the experimental study, model of RDS was set up in rabbits. The pressure of PaO_2 was determined and the morphologic changes of their lung tissues was observed after the rabbits were perfused with Dachengqi Decoction. The results showed that their PaO_2 were markedly increased and lung conditions greatly improved, which provided an experimental basis for RDS with Dachengqi Decoction. Among 12 cases; nine were moderate cases and three serious ones. During the course of treatment with Dachengqi Decoction, two patients died, covering only 16.6% of the total number of patients. This fact confirms the efficacy of Dachengqi Decoction in treating the post-traumatic RDS.

Key words Dachengqi Decoction, respiratory distress syndrome, PaO_2
(Original article on page 541)