

· 实验研究 ·

大黄对急性出血性卒中大鼠中枢神经二次损伤纤溶机制的影响

蔡定芳 戴巍 陈依萍 闻名 戴豪良

摘要 目的 观察大黄对急性出血性卒中大鼠中枢神经二次损伤现象的治疗作用,并探讨其可能作用机理。**方法** 自体血脑内注入造成大鼠急性出血性卒中模型,观察大黄对模型大鼠中枢神经二次损伤以及脑内纤溶酶原(PLG)和组织型纤溶酶原激活物(tPA)的影响。**结果** (1)大约 70% 模型大鼠于造模后 4~6 天再次出现神经功能缺损体征,第 4 天评分为(1.63±0.72)分,中枢神经二次损伤于造模后 6~8 天达到高峰,第 7 天评分为(2.32±1.12)分。(2)大黄能有效改善这种神经功能二次损伤现象。自用药后第 4 天起,大黄组大鼠神经功能缺损评分一直维持在(1.24±0.19)分左右,未出现明显中枢神经二次损伤现象。第 7 天大黄组大鼠神经功能缺损评分为(1.22±0.15)分,与模型组第 7 天比较,差异有显著性 $P<0.05$ 。(3)模型组大鼠第 3 天中枢 tPA mRNA 特异扩增产物及第 7 天中枢 PLG mRNA 特异扩增产物均明显高于假手术组;大黄组 tPA mRNA、PLG mRNA 表达明显低于模型组。**结论** 大黄能有效治疗急性出血性卒中大鼠中枢神经二次损伤,这一作用与大黄抑制急性出血性卒中大鼠中枢 tPA mRNA 及 PLG mRNA 表达有关。

关键词 急性出血性卒中;大黄;纤溶酶原;组织型纤溶酶原激活物

Effect and Mechanism of Rhubarb on Fibrinolysis in Secondary Damaged Central Nerve System of Rats with Acute Hemorrhagic Stroke CAI Ding-fang, DAI Wei, CHEN Yi-ping, et al *Zhongshan Hospital of Fudan University, Shanghai (200032)*

Objective To observe the effect of rhubarb in treating secondary damage of central nerve system (CNS) in rats with acute hemorrhagic stroke (AHS) and to explore the possible mechanism. **Methods** The rat's AHS model was established by autologous blood injection, the effect of rhubarb on the secondary damage of CNS, plasminogen (PLG) in brain and tissue type plasminogen activator (t-PA) were observed. **Results** (1) The nerve function deficit signs reappeared in about 70% model rats 4-6 days after modeling and reached the peak at day 6-8, scored as 1.63 ± 0.72 on day 4 and as 2.32 ± 1.12 on day 7; (2) Rhubarb could effectively improve the secondary nerve function damage, with the nerve deficit scores kept to 1.24 ± 0.19 from day 4 on, and no sign of secondary CNS damage was shown. The nerve deficit score was 1.22 ± 0.15 on day 7 in the rhubarb treated group, showing significant difference as compared with that in the model group ($P<0.05$); (3) The specific amplified products of t-PA mRNA on day 3 and that of PLG mRNA on day 7 in CNS of model group were significantly higher than those in the sham operated group and the rhubarb treated group. **Conclusion** Rhubarb could effectively reduce the secondary CNS damage in rats with AHS, it might be related with the suppressive effect of rhubarb on tPA mRNA and PLG mRNA expression in CNS.

Key words acute hemorrhagic stroke; rhubarb; plasminogen; tissue type plasminogen activator

大量临床观察提示,部分急性脑出血患者发病后 7~14 天左右出现中枢神经二次损伤现象:已经逐步

好转的神经功能缺损症状或体征突然加重,严重者甚至出现头痛、呕吐、嗜睡或意识障碍等。近期国外研究表明,这种现象可能与继发纤溶有关^[1,2]。为了探讨急性出血性卒中的纤溶过程与中枢神经二次损伤的关系,本研究选择纤溶酶原(plasminogen, PLG)和组织型纤溶酶原激活物(tPA)作为主要观察指标,探索大黄

基金项目:上海市卫生系统百人计划(No. 97BR016);国家自然科学基金资助项目(No. 30271639)

作者单位:复旦大学附属中山医院(上海 200032)

通讯作者:蔡定芳, Tel: 021-64041990, E-mail: dingfangcai@163.

com

治疗急性出血性卒中中枢神经二次损伤中的疗效及其可能作用机理。

材料与方法

1 主要试剂 逆转录试剂盒、Taq 酶、dNTP, 购自 MBI 公司; Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; DE-PC、琼脂糖、DNA ladder、溴化乙锭、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、无水 NaAc、EDTA Na₂、溴酚蓝、蔗糖, 购自北京鼎国公司; 发色底物试剂盒购自上海太阳生物技术公司; 生大黄粉购自中山医院中药房。

2 主要仪器 电泳仪, Pharmacia 公司; PTC-200PCR 仪, 美国 MJ 公司; 低温高速离心机, 上海离心机研究所; 5417C 台式离心机, 德国 Eppendorf 公司; 分光光度计, Pharmacia 公司; 凝胶成像分析系统, GE-NEGENIUS bio image system; 立体定向仪, Kopf 公司; 微泵推进器、100 μl 微量注射器, WPI 公司; 酶标仪, BIO-RAD 公司; REVCO 超低温冰箱, Asheville。

3 脑出血(ICH)大鼠模型的建立 实验大鼠以 10% 水合氯醛(3.6 ml/kg)腹腔注射麻醉后, 显微镜下股动脉插管取血 100 μl。在立体定向仪下, 使用微泵推进器匀速注入纹状体(前凶中线旁开 3 mm, 冠状缝前 0.02 mm, 深 5.5 mm)。留针 10 min。拔针后无血液自针道返流。麻醉苏醒后出现神经功能缺损症状视为造模成功。手术过程中保持环境在 25~30 ℃, 保持大鼠体温 37.0~37.5 ℃。假手术组只将针置入纹状体, 不注血, 其余同造模组。对照组不进行任何手术处理。

4 动物分组、处理及指标检测 雄性健康 10~12 周龄 SD 大鼠购自中国科学院上海实验动物中心, 体重 250~300 g。饲养于复旦大学附属中山医院动物房, 室温 22 ℃, 自由饮食饮水。实验动物分为对照、假手术、模型、大黄 4 组, 每组各时间点 10 只。大黄组用上述方法造模后 3 h 按 10 g/kg 体重腹腔注射 100% 大黄溶液, 每 24 h 重复注射 1 次, 直至动物处死; 模型组大鼠造模后第 1、3、5、7 天 4 个时间点分别断头处死动物取脑进行 PLG 基因与 tPA 基因检测; 同时取外周血行 PLG 活性与 tPA 活性检测。对照组、假手术组、模型组分别以等体积 10% 吐温生理盐水溶液替代大黄溶液, 余同大黄组。

5 神经功能缺损评分测定 造模后 1~12 天分别测定模型组和大黄组大鼠神经功能缺损评分, 采用 Zea-longa 6 分法^[3]。

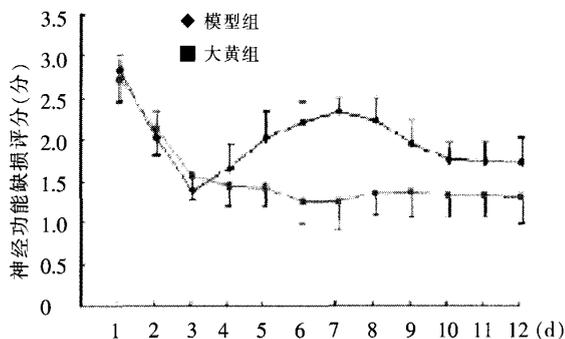
6 统计学方法 采用 *t* 检验。

结 果

1 大黄对急性脑出血大鼠模型神经功能缺损评

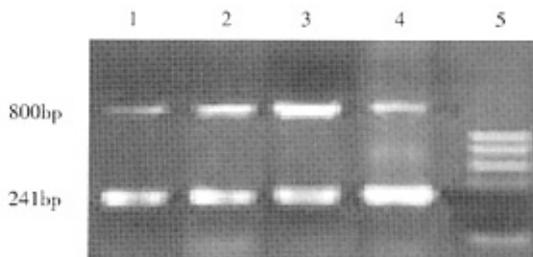
万方数据

分的影响 见图 1。模型组大鼠造模后 3 天内神经功能缺损体征逐渐恢复。第 1 天评分为(2.80 ± 0.23)分, 第 2 天为(2.01 ± 0.21)分, 第 3 天为(1.31 ± 0.16)分。但 70% 以上模型大鼠在 4~6 天再次出现神经功能缺损体征。第 4 天评分为(1.63 ± 0.72)分, 6~8 天达到高峰, 第 7 天评分为(2.32 ± 1.12)。大黄组大鼠造模后 3 天内神经功能缺损体征与模型组比较差异无显著性(*P* > 0.05)。但第 4 天起, 大黄组大鼠神经功能缺损评分维持在(1.24 ± 0.19)分左右, 未出现中枢神经二次损伤现象。第 7 天大黄组大鼠神经功能缺损评分仍为(1.22 ± 0.15)分, 与模型组第 7 天比较, 差异有显著性(*P* < 0.05), 提示大黄能有效改善急性脑出血大鼠中枢神经二次损伤。



注: 与模型组比较, **P* < 0.05; *n* = 10
图 1 大黄对急性脑出血大鼠中枢神经二次损伤神经功能缺损评分的影响

2 大黄对脑出血大鼠中枢 tPA 基因表达的影响 见图 2。大黄组第 3 天中枢 tPA mRNA(第 4 泳道)表达明显低于模型组(第 3 泳道)。凝胶图像分析仪灰度扫描显示: 大黄组第 3 天 tPA mRNA 表达的灰度扫描值为 0.443 ± 0.011, 模型组为 1.446 ± 0.133, 差异有显著性(*P* < 0.05, 见表 1)。



注: 1 为对照组; 2 为假手术组; 3 为模型组; 4 为大黄组; 5 为 Marker

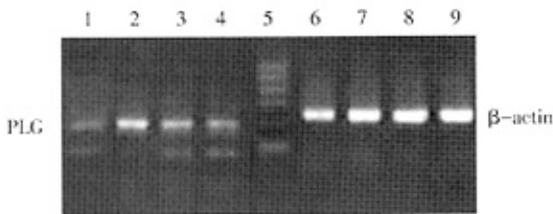
图 2 大黄对脑出血大鼠中枢 tPA 基因表达的影响

表 1 大黄对急性脑出血大鼠中枢 tPA mRNA 表达的影响 (目的基因/内参照, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	tPA mRNA
对照	10	0.363 ± 0.210
假手术	10	0.291 ± 0.016
模型	10	1.446 ± 0.133
大黄	10	0.443 ± 0.011*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

3 大黄对脑出血大鼠中枢 PLG 基因表达的影响见图 3。结果显示第 7 天大黄组中枢 PLG mRNA(第 1 泳道)表达明显低于模型组(第 2 泳道)。提示大黄能明显抑制急性脑出血大鼠第 7 天中枢 PLG mRNA 的表达。



注:1,6 为大黄组;2,7 为模型组;3,8 为假手术组;4,9 为对照组;5 为 Marker

图 3 大黄对脑出血大鼠中枢 PLG 基因表达的影响

凝胶图像分析仪灰度扫描显示:大黄组第 7 天 PLG mRNA 表达的灰度扫描值为 0.090 ± 0.003 ,模型组为 0.392 ± 0.019 ,差异有显著性($P < 0.05$,见表 2)。

表 2 大黄对急性脑出血大鼠中枢 PLG mRNA 表达的影响 (目的基因/内参照, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	PLG mRNA
对照	10	0.112 ± 0.006
假手术	10	0.124 ± 0.022
模型	10	0.392 ± 0.019
大黄	10	0.090 ± 0.003*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

讨 论

急性脑出血后中枢神经二次损伤现象正逐步引起国内外重视。近期研究表明,脑内注入纤溶酶原(PLG)或组织型纤溶酶原激活物(tPA)可以导致明显的脑损伤^[4,5]。纤溶酶原和纤溶酶等纤溶相关蛋白还可以引起脑内炎性细胞浸润、反应性小胶质细胞增生、神经细胞凋亡增加等一系列损伤反应^[6]。一般认为,脑出血后机体为了清除血肿必然启动纤溶系统。因此,这种继发纤溶亢进是机体重要的抗损伤过程^[7]。然而这种抗损伤本身又造成中枢神经的损伤。我们认为,脑出血后继发纤溶亢进是一把“双刃剑”;单纯地抑

制纤溶可能会导致血液的高凝状态进而影响血肿的吸收;一味地促进纤溶可能造成脑组织更大程度的损伤。理想的治疗方法应该是在不影响血肿溶解吸收的基础上减少继发纤溶带来的脑损伤。这是目前国际神经科学界面临的一大难题,也是临床亟待解决的一大难题^[8,9]。某些活血中药具有“活血不伤血,止血不留瘀”的特殊功效。能否合理正确应用中医中药解决急性出血性卒中中枢神经二次损伤是本文研究的重要目的。

本研究发现,立体定向仪下匀速向大鼠纹状体注入自体血 100 μ l,大鼠出现不同程度的神经功能缺损体征。这种病变虽然在造模后 1~3 天逐渐恢复。但是,大约 70%左右的大鼠于造模后 4~6 天再次出现神经功能缺损体征。第 4 天评分为(1.63 ± 0.72)分,6~8 天达到高峰,第 7 天评分为(2.32 ± 1.12)分。大黄组大鼠自用后第 4 天起,神经功能缺损评分一直维持在(1.24 ± 0.19)分左右,未出现明显中枢神经二次损伤现象。第 7 天大黄组大鼠神经功能缺损评分为(1.22 ± 0.15)分,与模型组第 7 天比较差异有显著性($P < 0.05$)。提示大黄能有效改善急性脑出血大鼠中枢神经二次损伤。进一步研究发现,模型组大鼠第 3 天中枢 tPA mRNA 特异扩增产物及第 7 天中枢 PLG mRNA 特异扩增产物均明显高于假手术组;大黄组 tPA mRNA、PLG mRNA 表达明显低于模型组。提示大黄改善急性脑出血大鼠中枢神经二次损伤与抑制中枢 tPA mRNA 及中枢 PLG mRNA 表达有关。

本实验结果证明大黄能有效减轻急性出血性卒中大鼠继发纤溶亢进引起的中枢神经二次损伤。大黄的主要功能为清热泻下、止血解毒、活血祛瘀。同时具有止血与活血作用的中药不多,大黄是重要的止血与活血并举中药。急性出血性卒中属中医学血溢脑脉之外病变。“离经之血为瘀血”,因此,治疗上如果只注重止血或抗纤溶就有可能留瘀,影响神经功能恢复;如果过分强调祛瘀或促进纤溶就有可能再次出血,加重神经原损伤。大黄的“活血不伤血,止血不留瘀”的特殊功效是治疗急性出血性卒中凝血与纤溶矛盾的理想药物,值得临床推广应用。

参 考 文 献

- 1 Sanchez CM, Suarez MA, Nebra A. Early activation of coagulation and fibrinolysis in traumatic brain injury and spontaneous intracerebral hemorrhage: a comparative study. *Neurologia* 2004;19(2): 44—52.
- 2 Mengzhou Xue, Marc R, Del Bigio. Acute tissue damage after injections of thrombin and plasmin into rat striatum.

- Stroke 2001;32:2164.
- 3 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 1989;20(1):84—91.
 - 4 Kushimoto S, Yamamoto Y, Shibata Y, et al. Implications of excessive fibrinolysis and alpha(2)-plasmin inhibitor deficiency in patients with severe head injury. Neurosurg 2001;49(5):1084—1089, 1089—1090.
 - 5 Morris DC, Zhang L, Zheng GZ, et al. Extension of the therapeutic window for recombinant tissue plasminogen activator with argatroban in a rat model of embolic stroke. Stroke 2001;32(11):2635—2640.
 - 6 Xi G, Reiser G, Keep RF. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? J Neurochem 2003;84(1):3—9.
 - 7 Kitaoka T, Hua Y, Xi G, et al. Delayed argatroban treatment reduces edema in a rat model of intracerebral hemorrhage. Stroke 2002;33(12):3012—3018.
 - 8 Xi G, Keep RF, Hoff JT. Pathophysiology of brain edema formation. Neurosurg Clin N Am 2002;13(3):371—383.
 - 9 Dijkhuizen RM, Asahi M, Wu O, et al. Rapid breakdown of microvascular barriers and subsequent hemorrhagic transformation after delayed recombinant tissue plasminogen activator treatment in a rat embolic stroke model. Stroke 2002;33(8):2100—2104.

(收稿:2004-07-26 修回:2004-10-20)

溃疡灵对应激性胃溃疡的防治作用

李金梅 李恩有 杨宝峰 曲松滨

高血压脑出血患者出现应激性溃疡往往是病情危重和预后不良的表现。中药对胃黏膜保护作用有很多报道,但对应激性胃溃疡的防治作用报道较少。我们将有抗应激性胃溃疡作用和健脾胃、提高免疫作用的中药按一定的比例制成溃疡灵,用于预防重型高血压性脑出血后应激性溃疡出血,现报告如下。

资料与方法

1 病例选择 选择既往无消化性溃疡和血液系统疾病的 120 例重型脑出血患者,按高血压性脑出血 Hunt 和 Hess 临床分级法属于Ⅲ~Ⅳ级,按入院时间先后顺序随机分为溃疡灵组与对照组各 60 例。溃疡灵组男性 32 例,女性 28 例,平均年龄(60.4±11.5)岁。头颅 CT 示基底节外侧型出血 32 例,丘脑出血 20 例,皮质下出血 4 例,桥脑出血 3 例,脑室出血 1 例;出血量<20ml 者 10 例,20~40ml 者 31 例,40⁺~60ml 者 19 例;对照组男性 31 例,女性 29 例,平均年龄(59.8±12.6)岁。头颅 CT 示基底节外侧型出血 30 例,丘脑出血 19 例,皮质下出血 3 例,桥脑出血 3 例,小脑出血 3 例,脑室出血 2 例。出血量<20ml 者 12 例,20~40ml 者 31 例,40⁺~60ml 者 17 例。两组患者病程为(4.3±0.6)天。两组患者的性别、年龄、脑出血部位及出血量无明显差异。

2 治疗方法 两组患者均给予吸氧、甘露醇与呋塞米交替使用,辅以白蛋白、复方氨基酸等对症支持治疗。溃疡灵组除以上常规治疗外,于发病 12h 内通过胃管鼻饲溃疡灵水煎剂,每日剂量:柴胡 20g 制半夏 10g 厚朴 10g 甘草 2.5g 大枣 3g 人参 5g 陈皮 10g 当归 10g。水煎服,每天 2 次,疗程 14 天。

凡肉眼见呕吐咖啡样液体、解柏油样黑便或粪便潜血试验++以上,表明有应激性溃疡出血的发生。溃疡灵组于治疗

前,用药第 7 天、14 天分别进行 1 次胃液 pH 值测定,对照组仅于发病 3 天内检测 1 次胃液 pH。两组患者均在入院第 1、7、14 天分别进行血常规、尿素氮、肌酐、胆红素及转氨酶检测。记录两组患者应激性溃疡出血的发生时间、出血量及预后情况。

3 统计学方法 用 Statview 5.0 软件,两组之间计数资料比较采用非配对 *t* 检验,两组疗效判定用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性。

结果 溃疡灵组治疗前胃液 pH 值 0.9±0.3,用药第 7 天胃液 pH 值 5.9±0.4,第 14 天达 6.4±0.4。应激性溃疡出血 10 例(16%,呕血 4 例,粪便潜血试验“+++”6 例)。1 个月内因脑出血死亡 12 例(20%);对照组治疗前胃液 pH 值(0.9±0.4),发生应激性溃疡出血 24 例(40%),其中呕血 7 例,呕血伴柏油样便 9 例,粪便潜血试验“+++”8 例。1 个月内因脑出血死亡 20 例(33%)。两组之间的应激性溃疡出血发生率及发病 1 个月内脑出血病死率差异有显著性($P<0.01$)。两组在治疗期间未见明显不良反应。

讨论 应激性溃疡出血是脑出血患者病情严重及预后不良的标志,其发生机制主要是急性高血压引起脑内结构受压、移位、直接刺激迷走神经核使迷走神经兴奋,胃酸分泌显著增多,从而导致胃黏膜的自身消化,形成急性应激性溃疡出血。溃疡灵组一些研究表明,溃疡灵中的柴胡具有镇静、安神作用,同时还有促进黏膜血运,黏膜保护的作用。厚朴、生姜、甘草等单味药有抑制溃疡发生或发展的作用。作为补剂的主要成分的人参、大枣等可以促进机体免疫功能的提高,提高机体抗应激反应的能力。用药后胃液 pH 最低保持在 4.5 以上,应激性溃疡出血的发生率和发病 1 个月内脑出血病死率均显著低于对照组,且无明显不良反应,临床应用溃疡灵鼻饲预防高血压性脑出血并发应激性溃疡出血疗效确切,比西药有较少的副作用,促进内环境稳态,作用温和、持久。

(收稿:2004-02-11 修回:2004-08-15)

作者单位:哈尔滨医科大学第一临床医学院(哈尔滨 150001)