

清开灵注射液辅助治疗对兔大肠杆菌脑膜炎 脑损伤保护作用及机制

岳少杰¹ 李乔俊¹ 罗自强² 汤飞鸽¹ 冯德云³ 邓世林⁴ 虞佩兰¹

摘要 **目的** 探讨清开灵注射液对大肠杆菌脑膜炎脑损伤的保护作用机制。**方法** 在采用氨苄青霉素治疗兔大肠杆菌脑膜炎模型的基础上,加用清开灵注射液辅助治疗。在注菌前、注菌后 16、26h 分别测定脑脊液中白细胞数、蛋白质含量和脑组织水、钠、钾、钙含量,并观察脑组织中基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的表达。**结果** 清开灵注射液辅助治疗后可明显减轻单纯抗生素治疗后细菌性脑膜炎模型兔脑脊液中白细胞数、蛋白质及脑组织水、钠、钙含量的增加和钾含量的下降,减弱脑组织 MMP-9 的表达。**结论** 清开灵注射液辅助治疗可防止单纯抗生素治疗细菌性脑膜炎时所引起的一过性炎症反应和脑损伤加重,其机制与钙拮抗作用和减弱脑组织中 MMP-9 的表达有关。

关键词 清开灵注射液;细菌性脑膜炎;脑损伤;大肠杆菌

The Neuroprotective Effects and Its Mechanisms of Qingkailing Injection on Bacterial Meningitis Induced by E. coli in Rabbits YUE Shao-jie, LI Qiao-jun, LUO Zi-qiang, et al Xiangya Hospital of Central South University, Changsha (410008)

Abstract **Objective** To explore the neuro-protective effect and mechanism of Qingkailing injection (QKL) against cerebral injury caused by E. coli-meningitis (CM). **Methods** The CM model rabbits were treated by ampicillin with QKL as adjuvant. The leukocyte count and protein content in cerebral spinal fluid (CSF), the contents of water, sodium, potassium and calcium in cerebral tissues were measured before, 16 h and 26 h after Bacillus coli injection respectively. The expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) was determined at the same time. **Results** Adjunctive treatment with QKL can not only inhibit the increase of leukocyte cells, protein content in CSF, and water, sodium, calcium content in cerebral tissues, but also the decrease of potassium content revealed during simple antibiotic treatment. It also can decrease the expression of MMP-9 in cerebral tissues of rabbits with CM. **Conclusion** As an adjunctive treatment, QKL can prevent transient inflammatory reaction and aggravation of brain injury in CM induced by simple antibiotic treatment, its mechanisms might relate with calcium antagonism and attenuation of MMP-9 expression in brain tissues.

Key words Qingkailing injection; bacterial meningitis; brain injury; Bacillus coli

细菌性脑膜炎是儿科临床常见的一种中枢神经系统感染性疾病。尽管目前应用各种新型抗生素,小儿细菌性脑膜炎的病死率和神经系统后遗症的发生率仍然相当高^[1]。近来研究发现在抗生素使用早期,由于细菌的大量破坏,常导致炎症反应、脑水肿与颅高压的

一过性加重^[1]。清开灵注射液系安宫牛黄丸方衍化而来的纯中药复方针剂,具有清热解毒,镇静安神,化痰祛瘀,醒脑开窍之功效。自 1975 年研制成功以来已广泛应用于临床多种疾病治疗,并获得了明显的疗效^[2]。本研究在抗生素治疗的基础上采用清开灵注射液辅助治疗,观察清开灵注射液辅助治疗对大肠杆菌脑膜炎时脑损伤的影响,并对其机制进行探讨。

基金项目:国家自然科学基金资助课题(No. 39700139),湖南省中医药管理局科学基金资助课题(No. 204048)

作者单位:1. 中南大学湘雅医院儿科(长沙 410008);2. 中南大学湘雅医学院生理学系;3. 中南大学湘雅医学院病理学系;4. 中南大学湘雅医学院中心实验室

通讯作者:岳少杰, Tel: 13786147893, E-mail: Shaojieyue@hotmail.com 或 Shaojieyue@163.com

材料与方法

1 动物及分组 清洁级大耳白兔 37 只,体重 1.7~2.1 kg,雌雄不拘,由中南大学湘雅医学院动物学部提供。随机分为 5 组:对照组(7 只)、模型组(8 只)、氨苄组(8 只)、预防组(7 只)和治疗组(7 只)。

2 试剂及药物 氨苄青霉素粉针剂(华北制药厂生产,批号:H13020668);清开灵注射液(由牛黄、水牛角、黄芩、金银花、栀子等组成,每毫升含黄芩甙 50mg 及总氮 25mg,北京中医药大学制药厂生产,批号:015001);埃希氏大肠杆菌:菌种号 44607,血清型 O₇:K₁:H₁,北京卫生部生物制品检定所提供;兔抗基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、多克隆抗体(一抗)、羊抗兔 IgG 抗体(二抗)及 DBA 显色液均由武汉博士德生物工程有限公司提供;硝酸纤维素膜由上海生物工程有限责任公司提供。

3 模型制备及给药方法 参照刘一心等^[3]建立的方法制备脑膜炎模型:用氨基甲酸乙酯(1g/kg)麻醉后进行兔小脑延髓池穿刺,抽出 0.5 ml 脑脊液(CSF),然后经小脑延髓池接种 4×10⁷ 埃希氏大肠杆菌细菌(colon-forming units,CFU)混悬液 0.5 ml;对照组同样进行小脑延髓池穿刺,注入等量生理盐水。注菌前、注菌后 16、26h 分别进行观察,并行小脑延髓池穿刺留取 CSF 0.5 ml 待测。氨苄组、预防组和治疗组均于小脑延髓池注入大肠杆菌 16h 后经耳缘静脉注射氨苄青霉素 100mg/kg,4h 后重复 1 次,共 2 次,总量为 200mg/kg。预防组在注入大肠杆菌前 30min 经耳缘静脉注射清开灵注射液 15ml/kg,1h 后再次给予 5ml/kg,总量为 20ml/kg;治疗组在氨苄青霉素治疗同时经耳缘静脉注射清开灵注射液 15ml/kg,1h 后再次给予 5ml/kg,总量为 20ml/kg。清开灵注射液及氨苄青霉素的用量及给药方法是参照我室以前的研究报道^[3,4]而定的。氨苄青霉素治疗 10h(注菌 26h)后,处死动物取脑备用,以测定脑组织水、钠(Na)、钾(K)、钙(Ca)含量,并观察脑组织中 MMP-9 的表达。

4 观察项目及检测方法

4.1 CSF 中白细胞计数 采集 CSF 后,立即取 10μl 在光学显微镜下用血细胞计数板进行白细胞计数,并计算每升 CSF 中白细胞数。

4.2 CSF 中蛋白质含量测定 CSF 4 000 r/min 离心 5 min 后取上清 0.1 ml,采用全自动生化分析仪检测蛋白质含量。

4.3 脑组织含水量测定 取 100 mg 大脑皮层组织,置于电热恒温箱内 105℃ 48 h 烤至恒重(两次干重误差≤0.1 mg),称干重,按 Elliott 公式计算脑组织含水量。

4.4 脑组织 Na、K、Ca 含量测定 按 Reed 法将测完全含水量的干脑标本,在原称量杯中依次加入浓硝酸和高氯酸,加热消化至清亮,用原子吸收光谱法测定脑组织 Na、K、Ca 含量。

4.5 MMP-9 测定 采用 Western blot 法测定,取 6%聚丙烯酰胺凝胶,蛋白电泳后电转移至硝酸纤维素膜上,封闭后加入抗 MMP-9 多克隆抗体(1:400),4℃ 平缓摇动过夜,洗膜后加入二抗,DAB 显色后照相。

5 统计学方法 应用 SPSS 统计软件,采用方差分析和 q 检验。

结 果

1 各组动物注菌前后 CSF 中白细胞数变化 见表 1。CSF 中白细胞数注菌前各组比较差异无显著性。治疗前(注菌后 16h):与对照组比较,各感染组均显著升高(P<0.01);模型组、氨苄组和治疗组升高的幅度均高于预防组(P<0.01)。治疗后(注菌后 26h):与对照组比较,各感染组仍显著升高(P<0.01);但与本组治疗前比较治疗组和预防组则明显下降(P<0.05 或 P<0.01),以预防组下降更明显(P<0.05 或 P<0.01);而氨苄组却进一步升高(P<0.01),并均明显高于其他各组(P<0.01)。表明预防组效果最好。

表 1 各组动物注菌前后 CSF 白细胞数变化
比较 (×10⁶/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	白细胞数		
		注菌前	注菌后 16h	注菌后 26h
对照	7	7.4±1.9	8.2±1.5	8.2±2.2
模型	8	7.3±1.2	5040.8±590.3*	4342.5±143.0*□
氨苄	8	9.0±1.4	5018.3±585.3*	6517.8±327.1*△△□
治疗	7	9.2±1.9	5002.0±203.2*	4019.0±220.1*△△□
预防	7	8.6±1.5	3513.2±882.3*△△△○	2052.0±242.8*△△△○□

注:与对照组比较,*P<0.01;与模型组比较,△P<0.05,△△P<0.01;与氨苄组比较,▲P<0.01;与治疗组比较,○P<0.05;与本组注菌 16h 比较,□P<0.01;下表同

2 各组动物注菌前后 CSF 中蛋白质含量变化 见表 2。CSF 中蛋白质含量注菌前各组比较差异无显著性。治疗前(注菌后 16h):与对照组比较,各感染组均显著升高(P<0.01);模型组、氨苄组和治疗组升高的幅度均优于预防组(P<0.01)。治疗后(注菌后 26h):与对照组比较,各感染组仍显著升高(P<0.01);但与本组注菌 16h 比较则均明显下降(P<0.01),以预防组下降更明显(P<0.01)。

表 2 各组动物注菌前后 CSF 蛋白质含量
变化比较 (g/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	CSF 蛋白质含量		
		注菌前	注菌后 16h	注菌后 26h
对照	7	0.17±0.03	0.17±0.02	0.19±0.04
模型	8	0.19±0.03	2.51±0.19*	1.39±0.15*□
氨苄	8	0.18±0.04	2.38±0.23*	1.74±0.24*△□
治疗	7	0.18±0.05	2.53±0.18*	1.42±0.11*△□
预防	7	0.20±0.03	1.55±0.16*△△○	0.68±0.08*△△○□

3 各组动物脑组织水、Na、K、Ca 含量结果 见表 3。与对照组比较,各感染组脑组织水、Na、Ca 含量均明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 K 含量明显降低($P<0.01$)。模型组、治疗组和预防组水、Na、Ca 含量增高的幅度明显低于氨苄组($P<0.01$),以预防组最低($P<0.01$)。脑组织 K 含量变化与此相反。

表 3 各组动物脑组织水、Na、K 和 Ca 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	水 (%)	Na	K	Ca
			(mg/g)		
对照	5	78.49±0.30	5.46±0.09	17.23±0.64	0.29±0.03
模型	6	81.42±0.19**	5.73±0.05**	15.73±0.69**	0.49±0.06**
氨苄	6	82.10±0.21**△△	5.87±0.04**△△	11.74±0.33**△△	1.62±0.06**△△
治疗	5	81.13±0.25**△▲	5.69±0.03**▲	15.83±0.49**▲	0.44±0.05**▲
预防	5	80.65±0.28**△△○	5.61±0.04**△△○	16.67±0.45*△▲○	0.37±0.05**△▲○

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与氨苄组比较,▲ $P<0.01$;与治疗组比较,○ $P<0.05$

4 各组动物脑组织 MMP-9 蛋白表达 见图 1。对照组脑组织 MMP-9 蛋白水平表达很低,各感染组 MMP-9 蛋白质水平表达增高,预防组 MMP-9 蛋白表达水平低于其他 3 组。表明正常时脑组织中 MMP-9 蛋白很少表达,炎性刺激可引起脑组织中 MMP-9 蛋白表达明显增强,清开灵注射液的预防性给药可抑制炎症所致的 MMP-9 蛋白的表达。

模型组 治疗组 氨苄组 对照组 预防组

图 1 各组动物脑组织 MMP-9 蛋白表达

讨 论

细菌性脑膜炎是由细菌引起的中枢神经系统感染性疾病,因此,有效的抗生素治疗是治疗细菌性脑膜炎的关键环节。但抗生素使用早期引起细菌溶解可促进 IL-1、IL-6 和 TNF-α 等细胞因子的产生,加重局部炎症反应和血脑屏障的进一步损伤,导致脑水肿、颅内高压的加重^[1]。本研究采用 β-内酰胺类抗生素氨苄青霉素治疗兔大肠杆菌脑膜炎时也发现在治疗早期出现 CSF 中白细胞数、蛋白质含量及脑组织水、Na、Ca 的含量增高和 K 含量降低的现象,进一步证实,在有效抗生素治疗早期存在脑膜炎反应和脑水肿的加重。

清开灵注射液是在《温病条辨》中安宫牛黄丸的基础上研制而成的一种纯中药复方制剂,具有清热解毒、镇静安神、醒脑开窍等多方面功能。本研究也发现清开灵注射液可降低大肠杆菌脑膜炎时 CSF 中白细胞

数和蛋白含量,并减轻单纯抗生素治疗早期所致脑膜炎炎症和脑损伤的一过性加重,且以清开灵注射液预防性用药作用更明显,证实清开灵注射液辅助治疗对细菌性脑膜炎脑损伤具有保护作用。

细菌性脑膜炎时由于脑组织缺血缺氧及兴奋性氨基酸的大量释放使得 Ca^{2+} 通道开放,钙内流增加导致细胞内钙负荷^[5]。本研究发现,清开灵注射液可抑制单纯抗生素治疗早期所致的大肠杆菌脑膜炎脑组织钙含量的增加,提示清开灵注射液对脑损伤的保护作用可能与抑制 Ca^{2+} 内流有关。这与本室以往报道清开灵注射液可以抑制谷氨酸所致的神经元突触体内 Ca^{2+} 的增加,减轻谷氨酸神经毒性所致大脑皮质和海马的损伤一致^[6,7]。

MMP-9 是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)超家族中分子量(92KD)最大的成员,主要分解基底膜中的 IV 型胶原蛋白和层粘连蛋白,大量的研究已经证明 MMP-9 在细菌性脑膜炎时血脑屏障的破坏,脑脊液中白细胞的渗出、脑水肿和脑损伤的发生中起重要作用^[8]。近年来的研究发现,正常时脑脊液中不含有 MMP-9,细菌性脑膜炎脑脊液中 MMP-9 含量显著增高,且增高的程度与神经系统后遗症的发生有关,认为脑脊液中高水平的 MMP-9 是细菌性脑膜炎神经系统后遗症发生的危险因素^[9]。采用 MMPs 抑制剂辅助治疗实验性细菌性脑膜炎可明显的提高动物的生存率,减轻脑损伤的程度^[10]。本研究结果表明,清开灵注射液可明显抑制细菌性脑膜炎时脑组织中 MMP-9 的表达,说明清开灵注射液的脑保护作用与抑制脑组织 MMP-9 的表达有关。清开灵注射液抑制 MMP-9 表达的机制尚不清楚,可能是通过多种途径实现抑制细菌性脑膜炎时脑组织中 MMP-9 的表达。

参 考 文 献

1 Chaudhuri A. Adjunctive dexamethasone treatment in acute bacterial meningitis. Lancet Neurol 2004;3(1):54—62.

2 杨坚毅,陈惠红.清开灵注射液临床与药理研究进展.中国医院药学杂志 2001;21(8):494—497.

Yang JY, Chen HH. Progress in clinical and pharmacological researches on Qingkailing injection. Chin Hosp Pharm J 2001; 21(8):494—497.

3 刘一心,虞佩兰,李泳芳,等.山莨菪碱对大肠杆菌脑膜炎兔脑脊液的影响.中华医学杂志 1993;73(5):289—291.

Liu YX, Yu PL, Li YF, et al. Effects of anisodamine and ampicillin on cerebrospinal fluid in experimental rabbits with E. coli meningitis. Natl Med J Chin 1993;73(5):289—291.

- 4 岳少杰,罗自强,虞佩兰,等. 清开灵对谷氨酸神经毒性脑水肿的保护作用. 北京中医药大学学报 1998;21(4):32—33.
Yue SJ, Luo ZQ, Yu PL, et al. Effects of Qingkailing in resisting neurotoxicity cerebral edema caused by glutamic acid. J Beijing Univ TCM 1998;21(4):32—33.
- 5 Ko SY, Shim JW, Kim SS, et al. Effects of MK-801 (dizocilpine) on brain cell membrane function and energy metabolism in experimental Escherichia coli meningitis in the newborn piglet. J Korean Med Sci 2003;18(2):236—241.
- 6 陶永光,岳少杰,俞燕. 清开灵对大鼠谷氨酸神经毒性脑水肿时突触体游离钙的影响. 中国当代儿科杂志 2000;2(5):326—328.
Tao YG, Yue SJ, Yu Y, et al. Effect of Qingkailing on free calcium of synaptosomes in rats with neurotoxic brain edema induced by L-glutamate. Chin J Contemp Pediatr 2000;2(5):326—328.
- 7 岳少杰,曾庆善,周建华,等. 清开灵抗大鼠谷氨酸神经毒性脑损伤的实验研究. 中国中西医结合杂志 2000;20

(11):842—845.

- Yue SJ, Zeng QS, Zhou JH, et al. Experimental study of protective effect of Qingkailing on glutamate induced neurotoxic damage of brain. Chin J Integr Tradit West Med 2000;20(11):842—845.
- 8 Lee KY, Kim EH, Yang WS, et al. Persistent increase of matrix metalloproteinases in cerebrospinal fluid of tuberculous meningitis. J Neurol Sci 2004;220(1—2):73—78.
- 9 Leppert D, Leib SL, Grygar C, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. Clin Infect Dis 2000;31(1):80—84.
- 10 Meli DN, Loeffler JM, Baumann P, et al. In pneumococcal meningitis a novel water-soluble inhibitor of matrix metalloproteinases and TNF-alpha converting enzyme attenuates seizures and injury of the cerebral cortex. J Neuroimmunol 2004;151(1—2):6—11.

(收稿:2004-11-24 修回:2005-03-28)

慢性前列腺炎(肾阳虚型)患者免疫功能及性激素水平的测定 ——附 50 例临床报告

屈森林 赵润璞 成凤韬 琚保军 彭英克 陈铸 陈潇雨

2002 年 5 月—2003 年 10 月,我们在临床选择慢性前列腺炎(CP)患者(肾阳虚型)为观察对象,通过对其性激素及免疫功能水平的测定,以期慢性前列腺炎的病因学治疗方法提供有重要意义的指标,并为中医辨证分型提供较客观的量化标准。

对象与方法

1 诊断标准 西医诊断参考全国高等中医院校统编教材《西医外科学》(第 6 版)及吴阶平主编《泌尿外科学》标准制定。中医证候诊断参照国家技术监督局发布《中医临床诊疗术语》及《中华人民共和国中医药行业标准》制定。

2 一般资料 50 例患者均为本院门诊或住院患者,年龄 20~50 岁,平均(39.4±10.2)岁;病程 3~60 个月,平均(22.36±10.23)个月。健康人 20 名为本院体检的健康男性,年龄 20~50 岁,平均(39.2±12.2)岁;作为有关指标检测正常参考值。

3 测定指标 在停用各种临床用药 2 周后,抽取晨起空腹静脉血,测定 T 淋巴细胞亚群(CD₃、CD₄、CD₈、CD₄/CD₈)及睾酮(T)、雌二醇(E₂)含量,按试剂盒说明书操作。

结果

1 两组 T 淋巴细胞亚群测定结果 CD₃、CD₄、CD₄/CD₈

含量(%):CP 组分别为 52.4±4.6、28.7±3.8、和 0.81±0.15,正常组分别为 71.5±6.2、45.7±5.3、和 1.66±0.33,CP 组均显著低于正常组(P<0.01),说明 CP 患者细胞免疫功能低下。CP 组血清 CD₈ 含量[(32.7±4.0)%]变化虽有增高趋势,但与正常组[(27.9±5.0)%]比较差异无显著性。

2 两组 T 和 E₂ 测定结果 血清 T 含量:CP 组[(10.7±6.0)μL/L]明显低于正常组[(19.6±4.8)μL/L, P<0.01];E₂ 水平:CP 组[(61.7±1.7)μL/L]明显高于正常组[(52.5±2.9)μL/L, P<0.01],说明性激素水平变化可能是 CP 发病因素之一。

讨论 中医学中无前列腺炎的病名,其多归属于“淋症”、“精浊”、“白淫”等范畴。本病病位在肾、膀胱、精室,涉及多个脏腑,疾病初期以实证居多,日久多见虚证。肾为先天之本,主生殖与封藏,前列腺炎的发生和不易治愈的根本原因在于肾虚气化障碍。本结果提示,CP 的炎症反应是全身免疫功能低下的表现,病原体感染与炎症可持续存在,反复发作不易康复。性激素的失衡与 CP 的发病也有着相当密切的关系,男性性欲的维持有赖于体内性激素水平的正常和性器官的功能正常。由上可见,在慢性前列腺炎(肾阳虚型)患者的辨证治疗过程中,应尤其注意其免疫功能的变化和性激素的失衡,正所谓“正气存内,邪不可干”。机体的免疫功能是人体抵抗邪病的能力,亦是机体内环境稳定的重要因素。故而增强免疫功能和改善性激素的水平必定会使本病患者的治疗更为有效。

(收稿:2004-09-22 修回:2005-03-16)

作者单位:河南中医学院第一附属医院泌尿外科(郑州 450003)

通讯作者:屈森林, Tel:0371-66231458, E-mail: qumiaolin@yahoo.