

安宫清开灵注射液对自发性高血压大鼠脑出血后炎症反应的影响^{*}

□徐 雅 李澎涛^{**} 陈 杰 贾 旭 (北京中医药大学 北京 100029)

摘要:目的:观察安宫清开灵注射液对胶原酶诱导的自发性高血压大鼠(SHR)脑出血模型脑组织中多环节炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1和 NF- κ B表达的影响,探讨安宫清开灵注射液阻抑脑出血后炎症反应的作用环节以及作用效果。方法:成年 SHR 大鼠,雌雄各半,随机分成正常组、模型组、安宫清开灵低剂量组、安宫清开灵中剂量组、安宫清开灵高剂量组、阳性对照组(清开灵注射液)。基底核注射胶原酶法复制大鼠 48h 脑出血模型。应用免疫组化法检测脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1和 NF- κ B的表达情况。结果:脑出血 48h 大鼠脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1以及 NF- κ B均有不同程度的表达。安宫清开灵中剂量组均能明显阻抑出血后 48h 脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1和 NF- κ B表达的增加;安宫清开灵低剂量组可以明显抑制 ICAM-1和 NF- κ B的表达,而对 TNF- α 和 IL-1 β 的作用不明显;安宫清开灵高剂量组对 TNF- α 、IL-1 β 和 ICAM-1表达的具有较强的抑制作用。结论:安宫清开灵注射液对抑制脑出血后炎症因子和黏附分子的表达具有良好的作用,从而能够减轻炎性损伤。其中以中剂量组作用效果尤为突出,对脑出血后 48h 前炎症因子和黏附分子的表达都有显著的抑制作用,可以在多环节干预炎症反应过程、阻抑脑出血后损伤级联反应从而发挥保护神经元的作用。

关键词:脑出血 炎症反应 前炎症细胞因子 安宫清开灵注射液

脑出血目前尚缺乏有效的药物治疗手段。其中,血肿周围脑组织炎症反应并导致迟发性水肿、神经细胞凋亡提示这些可以作为治疗的靶点。近几年来炎症

反应在脑出血中的作用受到越来越多的重视。为了研究更加有效的治疗手段,本文以炎症反应以及核转录因子- κ B(NF- κ B)、前炎症细胞因子(TNF- α 和 IL-1 β)和黏附分子(ICAM-1)作为切入点,观察安宫清开灵注射液发挥脑保护作用的效应环节和作用靶

收稿日期:2006-10-10

修回日期:2006-11-30

* 科技部国家 863 计划项目(2002AA2Z3220):清开灵注射液的二次开发,负责人:李澎涛。

** 联系人:李澎涛,本刊学术副主编,教授,医学博士,博士生导师,主要研究方向:神经病理学与实验方剂学研究;Tel 010-64287015, E-mail lpao@263.net

点,为药物进入临床奠定理论基础。

一、材料与方法

1 实验动物及分组

健康自发性高血压大鼠 60 只,雌雄各半,体重 250~300 g 购于北京维通利华实验动物中心,合格证号 SCKX(京)2002~0003。将动物随机分为正常组(N)、模型组(M)、低剂量组(QL)、中剂量组(QM)、高剂量组(QH)、阳性药对照组(C)6组,每组 10 只。

2 试剂及器材

主要试剂:Ⅵ型胶原酶(美国 Sigma 公司),兔抗 NF- κ B P65 多克隆抗体(美国 Santa Cruz Bio Tech 公司);兔抗 TNF- α 多克隆抗体、兔抗 IL-1 β 多克隆抗体、兔抗 ICAM-1 多克隆抗体(武汉博士德生物技术有限公司)。免疫组化 ABC 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

仪器:SN-2 型脑立体定位仪(日本 NARISHGE 公司产品);微量进样器(上海保西玻璃仪器厂);Shandon 石蜡切片机(英国);Olympus 光镜(日本);Image-pro plus5.1 生物学图像分析系统。

3 大鼠脑出血模型的建立

参照 Rosenberg^[1]等报道的方法,大鼠经水合氯醛(0.4g/kg)腹腔注射麻醉后,按包新民等^[2]的方法将

大鼠固定在立体定位仪上,取头皮正中切口,剪开骨膜,暴露前囟,于前囟后 1mm,中线向左旁开 4mm 处钻一直径为 1mm 的小孔,用固定于立体定位仪的微量进样器沿钻孔进针,进针深度为 5mm(即尾状核位置),缓慢注射Ⅵ型胶原酶 0.5U(用等渗盐水配制成 1U/ μ l)。注射后留针 5min 退针后缝合皮肤,回笼饲养,给予正常进食、进水,室温控制在 25 $^{\circ}$ C。入组大鼠均为试验结束时取脑证实颅内明确血肿。

4 给药方式及途径

采用腹腔注射给药。除假手术对照组外,其余各组造模后立即给药一次,以后每隔 24 小时给药一次。安宫清开灵注射液低剂量组为 0.1mL/100g 体重;中剂量组为 0.2mL/100g 体重;高剂量组为 0.4mL/100g 体重;阳性对照组腹腔注射清开灵注射液 0.3mL/100g 体重;均以生理盐水稀释至 0.9mL/100g 体重;模型组腹腔注射生理盐水 0.9mL/100g 体重。

安宫清开灵注射液(简称安宫清开灵,由栀子苷、黄芩苷、珍珠母、猪去氧胆酸等组成,药物组分含量为 90mg/mL),清开灵注射液(简称清开灵,由胆酸、珍珠母、猪去氧胆酸、栀子、水牛角、板蓝根、黄芩苷、金银花组成,药物组分及生药含量为 313mg/mL),两药均由北京中医药大学药厂提供。

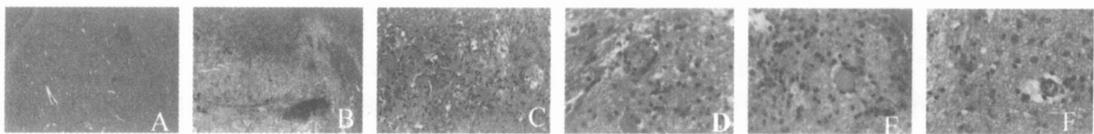


图 1 脑出血 48 小时脑组织的病理学改变

A 正常脑组织(40X); B 出血区脑组织(40X); C 出血周围脑组织(200X); D 出血周围脑组织(400X); E 出血区脑组织(400X); F 出血周边区脑组织(400X)

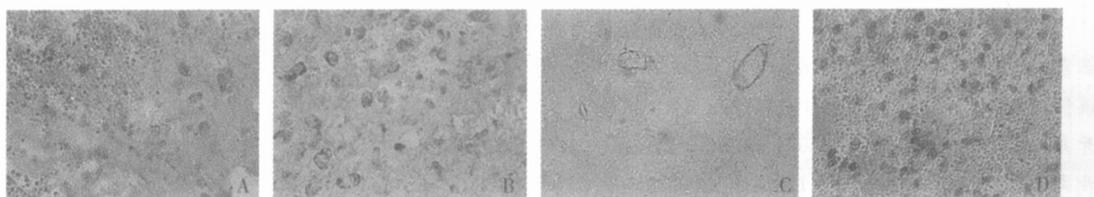


图 2 脑出血后 48 小时脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1 以及 NF- κ B 的表达

A TNF- α 主要表达在神经细胞(400X); B IL-1 β 主要表达在神经细胞(400X); C ICAM-1 主要表达在出血侧脑组织中的血管上(400X); D NF- κ B 主要表达在神经细胞(400X)

5 取材处理

造模后 48 h 大鼠经水合氯醛麻醉, 在冰上迅速取出全脑, 沿注射胶原酶进针孔, 冠状面切厚约 2mm 的脑片, 置入 4% 多聚甲醛中, 固定 24 h 常规石蜡包埋, 切片厚 6 μ m, 分别进行常规 HE 染色和免疫组织化学染色。

6 免疫组化染色

免疫组织化学方法采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶 (SP) 法。石蜡切片常规脱蜡至水, 用正常山羊血清封闭 30 min, 一抗分别为 1:100 兔抗 NF- κ B P65 多克隆抗体, 1:100 兔抗 THF- α 多克隆抗体, 1:100 兔抗 IL-1 β 多克隆抗体和 1:100 兔抗 ICAM-1 多克隆抗体, 室温下孵育过夜, 按 ABC 试剂盒说明书进行操作, DAB (棕黄色或蓝紫色) 显色系统显色后用光镜观察。阴性对照用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗进行孵育。采用 Image-pro plus 5.1 生物学图像分析系统测定平均面积和百分比。

7 统计学处理

各组实验数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间显著性检验采用 *t* 检验。

二、结果

1 组织病理学改变

HE 染色发现, 脑出血后 48h, 基底核部位可见典型的弥漫型出血灶, 并有小血肿形成 (见 B)。出血灶中可见大量红细胞及成群分布以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润, 组织水肿, 大量神经元核结构模糊, 变性

坏死, 并可见噬神经细胞现象 (见 C)。在出血灶周边的脑组织疏松, 并有淋巴细胞浸润以及神经元和神经胶质细胞水肿表现; 血管内皮细胞肿胀, 管腔内血细胞聚集嵌塞微血管 (见 DD); 而各用药组与模型组比较, 出血灶周围组织疏松程度降低, 炎细胞的浸润、血肿周围组织水肿特别是出血灶周边组织微血管内皮细胞的损伤显著减轻, 未见血细胞聚集, 管腔通畅, 以安宫清开灵中、高剂量组最为显著 (见 E, F)。

2 免疫组织化学改变

脑出血后 48 小时, 模型组脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1 以及 NF- κ B 的表达显著高于正常组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 安宫清开灵低剂量组与模型组比较, 出血灶及周围脑组织中 ICAM-1 以及 NF- κ B 的表达显著降低 ($P < 0.01$), 而 TNF- α 和 IL-1 β 的表达差异不显著 ($P > 0.05$); 安宫清开灵中剂量组与模型组比较, 出血灶及周围脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1 以及 NF- κ B 的表达均显著降低 ($P < 0.01$); 安宫清开灵高剂量组与模型组比较, 出血灶及周围脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 ICAM-1 的表达显著下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而 NF- κ B 的表达差异没有统计学意义; 阳性对照药清开灵注射液组与模型组比较, TNF- α 和 NF- κ B 的表达显著减少 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而 IL-1 β 和 ICAM-1 的表达差异不显著 ($P > 0.05$)。如表 1 所示。

三、讨论

中枢神经系统炎症反应的基本标志是小胶质细胞

表 1 脑出血 48h 脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1 以及 NF- κ B 的表达

	N	百分比			平均面积
		TNF- α	IL-1 β	ICAM-1	
正常组	10	4.62E-06 \pm 6.01E-07	0.32E-05 \pm 1.13E-07	30.82 \pm 4.24	44.17 \pm 4.97
模型组	10	7.06E-06 \pm 1.41E-06 Δ	2.97E-05 \pm 1.39E-05 $\Delta\Delta$	47.44 \pm 6.80 $\Delta\Delta$	85.55 \pm 31.03 Δ
安宫清开灵低剂量组	10	8.02E-06 \pm 1.53E-06	1.93E-05 \pm 1.15E-05	32.89 \pm 8.05**	49.50 \pm 27**
安宫清开灵中剂量组	10	4.15E-06 \pm 9.28E-07**	0.81E-05 \pm 3.26E-06**	37.5 \pm 6.32**	51.20 \pm 8.82**
安宫清开灵高剂量组	10	3.94E-06 \pm 1.25E-06**	1.15E-05 \pm 4.13E-06**	36.75 \pm 12.11*	61.46 \pm 16.48
阳性对照组	10	3.71E-06 \pm 1.38E-06**	2.49E-05 \pm 1.58E-05	41.01 \pm 12.96	57.21 \pm 12.49*

注: 与假手术组比较 $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

的激活和白细胞的浸润。激活的小胶质细胞和浸润的白细胞可释放 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 等炎症因子^[3]。在炎症反应的初期,前炎症细胞因子主要是 IL-1 β 和 TNF- α , 他们能够激活内皮细胞, 促进他们募集巨噬细胞、中性白细胞和 T 细胞穿过血脑屏障^[4]。而 ICH 后血肿周围炎症反应的前提条件是炎症细胞粘附于血管内皮细胞, 黏附分子是介导粘附的重要因素, 其中起核心作用的是 ICAM-1, 它也是中枢神经系统中细胞表达最广泛的黏附分子, 脑中几乎所有的细胞如小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、神经细胞均有 ICAM-1 的表达; 而 TNF- α 、IL-6 均能增加 ICAM-1 的生成和表达, ICAM-1 可使激活的小胶质细胞与 ICAM-1 阳性神经元相黏附, 引起神经元损伤^[5]。

核转录因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 是一种多向性转录调节蛋白, 是启动 TNF- α 、IL-6、ICAM-1、VEGF 和 MMP-s 等炎症因子转录、合成的关键物质。正常情况下, NF- κ B 由两个蛋白亚基 (NF- κ B P50 和 NF- κ B P65) 组成二聚体, 与其抑制物 I κ B 结合, 存在于静止期细胞的胞浆中。当受到某些刺激时, 通过特定的蛋白激酶, 使 I κ B 磷酸化而被降解, 此二聚体被激活释放, P65 和 P50 进入细胞核, 从而启动一系列免疫和炎症反应相关基因的转录, 诱导众多细胞因子的表达。

本研究显示, 脑出血后 48h NF- κ B 广泛表达于出血侧血肿周围区, 皮质、海马等部位, 主要在星形胶质细胞、神经及内皮细胞表达。表明脑出血作为一种刺激, 诱导了 NF- κ B 的合成, 与文献报道基本一致。而小、中剂量的安宫清开能够抑制 NF- κ B 的表达, 可以阻断 NF- κ B 的作用。表明安宫清开灵注射液可以通过抑制 NF- κ B 蛋白的合成与分泌, 从而起到抑制 TNF- α 、ICAM-1 等炎症因子相关基因的转录、翻译以及蛋白的合成, 发挥了对炎症反应上游信号启动的抑制作用, 对脑出血后炎症反应造成的继发性脑损伤具有保护作用。

脑出血后 48h 脑出血区以及出血周围区可见 TNF- α 、IL-1 β 以及 ICAM-1 的表达, TNF- α 和 IL-1 β 主要表达于胶质细胞、小胶质细胞和神经元。

ICAM-1 主要表达于血管内皮细胞上。安宫清开灵注射液由于剂量的不同对各种炎症因子表达的作用也各有特征。其中, 小剂量的安宫清开灵只能够抑制 ICAM-1 的表达, 而对 TNF- α 和 IL-1 β 的作用不突出; 中剂量的安宫清开灵注射液可以显著抑制出血灶及出血周边区 TNF- α 、IL-1 β 以及 ICAM-1 的表达, 作用强烈并且靶点广泛; 大剂量的安宫清开灵也可以抑制出血区以及出血周围区 TNF- α 、IL-1 β 以及 ICAM-1 的表达, 但作用强度弱于中剂量。组织病理学中脑组织炎症反应以及微血管损伤表现与此具有一致的变化趋势。表明中剂量安宫清开灵注射液在阻抑炎症反应这一病理环节中的作用效果最佳、范围最广。

以上分析显示, 不同剂量的安宫清开灵注射液在阻抑脑出血后炎症反应以及前炎症细胞因子激活上具有不同的作用强度。中小剂量具有阻抑炎症反应上游信号的作用; 而中大剂量抑制前炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和黏附分子 ICAM-1 的表达的作用效果较为突出; 大剂量突出作用于抑制前炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和黏附分子 ICAM-1 蛋白的合成。本实验结果为安宫清开灵注射液进入临床研究及合理使用剂量提供了实验依据。

参考文献

- 1 Gary A. Rosenberg, Sheila MunBryce, Mary Wesley, et al. Collagenase-Induced Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Stroke*, 1990, 21: 801~807.
- 2 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- 3 Xue M, Del Bigio MR. Intracortical hemorrhage injury in rats: relationship between blood fractions and brain cell death. *Stroke*, 2000, 31: 1721~1727.
- 4 del Zoppo G, Gins I, Hallenbeck M, et al. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol*, 2000, 10: 95~112.
- 5 Hery C, Sebire S, Peudenie M, et al. Adhesion to human neurons and astrocytes of monocytes: the role of interaction of CR3 and ICAM-1 and modulation by cytokines. *J Immunol*, 1995, 57: 1012~109.

(Continued on Page 64)

Pulmonary Delivery of Traditional Chinese Medicines

*Wang Chun, Liu Xiaobin, Quan Lhui Liu Chunyu, Liao Yonghong**

Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences 100094 Beijing, China

This paper discusses a range of issues concerning the pulmonary delivery of traditional Chinese medicine, including forms of dosage, methods for assessing the therapeutic effects, and difficult aspects of delivering traditional medicines via the pulmonary path. Authors believe that pulmonary delivery remains a highly promising alternative for TCM delivery as some tough challenges so far encountered in commercial applications can be addressed through an enhanced R&D effort.

Keywords pulmonary delivery, metered dose inhaler, Nebulizer, traditional Chinese medicine

(责任编辑:张述庆, 责任编审:张志华, 责任译审:邹春申)

(Continued from Page 35)

Effects of An Gong Qing Kai Ling Injection on Inflammatory Reaction in Spontaneous Hypertensive Rats with Cerebral Hemorrhage

Xu Ya, Li Pengtao, Chen Jie, Jia Xu

Beijing University of Chinese Medicine 100029

In this paper, authors studied the effects of An Gong Qing Kai Ling Injection on the expression of TNF- α , IL-1 β , ICAM-1 and NF- κ B in the brain tissue of SHR having cerebral hemorrhage. They also discussed the links and effects of An Gong Qing Kai Ling Injection in inhibiting inflammatory reactions. In the study, the SHRs were randomly divided into six groups: normal group, model group, low-dose group, middle-dose group, high-dose group, and positive control group. Cerebral hemorrhage was induced using collagenase VII in SHR. Immunohistochemistry was employed to identify the expression of TNF- α , IL-1 β , ICAM-1 and NF- κ B in the brain tissues of SHRs having cerebral hemorrhage 48 hours after cerebral hemorrhage. TNF- α , IL-1 β , ICAM-1 and NF- κ B produced an expression. The middle-dose group showed an obvious effect on inhibiting the increased expression of TNF- α , IL-1 β , ICAM-1 and NF- κ B. The low-dose group can inhibit the increased expression of ICAM-1 and NF- κ B, though having no apparent effect on TNF- α and IL-1 β . The high-dose group inhibited the increased expression of TNF- α and IL-1 β and ICAM-1 in an apparent manner. It is concluded that An Gong Qing Kai Ling Injection is of a noticeable effect on inhibiting the expression of inflammatory factors and adhesion molecules, which in turn alleviates the damage of inflammation. The middle-dose application can noticeably inhibit the expression of pro-inflammatory factors and adhesion molecule 48 hours after cerebral hemorrhage, interfering inflammatory reactions in a number of links, and inhibiting the cascade reaction after cerebral hemorrhage. It plays a role of protecting the neurons.

Keywords Cerebral hemorrhage, inflammation reaction, pro-inflammatory factor, An Gong Qing Kai Ling Injection

(责任编辑:王, 责任编审:杜力军, 责任译审:邹春申)