

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)03-0236-04

麻黄碱在大鼠脑缺血-再灌注损伤中的意义

王鑫¹, 肖农¹, 周江堡¹, 张晓萍² (重庆医科大学附属儿童医院:¹神经内科,²儿科研究所,重庆400014)

Role of ephedrine against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

WANG Xin¹, XIAO Nong¹, ZHOU Jiang-Bao¹, ZHANG Xiao-Ping²¹Department of Neurology, ²Institute of Pediatrics, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China

【Abstract】 AIM: To investigate the protective effects of ephedrine on the rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. **METHODS:** *In vivo*: Normal rats were randomly divided into 4 groups and injected respectively with ephedrine (2, 4, 8 mg/kg) and equal volume normal saline, once every 3 d, totally for 4 times. The plasma concentrations of thromboxane B₂ (TXB₂) and 6-keto-PGF_{1α} were detected by radio-immunohistochemistry. The ratio of TXB₂ to 6-keto-PGF_{1α} (T/P) was calculated. The sub-grouping, administrated doses and manner in middle cerebral artery occlusion (MCAO) group are same as the normal control group; *In vitro*: The brain microvascular endothelial cells were cultured and divided into 3 ephedrine groups (2, 4 and 8 mg/L) and 1 control group (no ephedrine). The plasma concentration of 6-keto-PGF_{1α} was detected after 2 h. **RESULTS:** *In vivo*: In the normal rats, T/P, the plasma concentrations of TXB₂ and 6-Keto-PGF_{1α} in the groups treated with 8mg/kg ephedrine were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). In the MCAO rats, compared to the control group, the TXB₂ concentration and T/P in all treated groups were significantly lower ($P < 0.05$); *In vitro*: The concentration of 6-Keto-PGF_{1α} in each group was not different statistically ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** The protective effects of ephedrine on the MCAO rats may be related to balancing the ratio of TXA₂/PGI₂.

【Keywords】 thromboxane; prostaglandin; ephedrine; cerebral ischemia; rat

【摘要】目的:探讨麻黄碱对缺血-再灌注损伤大鼠的神经保护机制。方法:体内部分:正常大鼠,分为4组,每组6只,分别腹腔注射不同剂量(2, 4, 8 mg/kg)麻黄碱和等体积生理

盐水,每3日1次,共4次,应用放射免疫组织化学方法检测大鼠血浆中血栓素B₂和6-酮前列腺素F_{1α}浓度,并且计算两者比值。MCAO模型大鼠分组、给药剂量及方法同于正常组。体外部分:培养大鼠脑皮质微血管内皮细胞,分为麻黄碱给药组(培养基麻黄碱的浓度分别为2, 4, 8 mg/L)和对照组(培养基无麻黄碱)培养2 h后检测6-酮前列腺素F_{1α}浓度。结果:体内部分:①正常大鼠:麻黄碱8 mg/kg组TXB₂、6-Keto-PGF_{1α}和T/P低于正常对照组($P < 0.05$)。②MCAO模型大鼠:各给药组TXB₂和T/P均低于对照组($P < 0.05$)。③MCAO模型对照组TXB₂、6-Keto-PGF_{1α}和T/P高于正常对照组($P < 0.05$)。体外试验:麻黄碱各浓度组6-Keto-PGF_{1α}与对照组的差别无统计学意义($P > 0.05$)。结论:麻黄碱对大鼠血浆TXA₂-PGI₂平衡的影响可能与其对缺血-再灌注损伤大鼠的神经保护性作用有关。

【关键词】 血栓素; 前列腺素; 麻黄碱; 脑缺血; 大鼠

【中图分类号】 R285.1 **【文献标识码】** A

0 引言

祖国传统医学认为,麻黄具有活血通络的功效,可明显改善中风后神经功能。我们前期研究发现麻黄碱可以促进中脑动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠的运动功能康复,在蛋白及基因水平可以促进GAP-43及SYP的表达增高^[1],对大鼠脑缺血-再灌注损伤有一定保护作用。为此,我们试图通过体内和体外试验观测麻黄碱对SD大鼠TXA₂-PGI₂平衡的影响,进一步探讨麻黄碱对大鼠脑缺血-再灌注保护作用的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级成年SD大鼠48只,体质量220~250 g,雌雄各半,重庆医科大学试验动物中心提供。随机分为8组:正常对照组、模型对照组、正常大鼠给药组与MCAO模型大鼠给药组(麻黄碱2, 4和8 mg/kg),每组6只。SL型CO₂培养箱(美国,Nuaire)荧光显微镜(日本,Olympus),电子分析天平(西班牙,COBOS),手术器械等。血栓素B₂放射免疫分析试剂盒及6-酮前列腺素F_{1α}放射免疫分析试剂盒购自江苏血液研究所,人VIII因子相关抗原试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

收稿日期 2006-04-24; 接受日期 2006-08-27

基金项目 重庆市卫生局中医药科研项目(2003-B-38)

通讯作者:肖农. Tel (023)63622984 Email xiaonongwl@sina.com

作者简介:王鑫. 硕士生(导师肖农). Tel (023)63622634

Email wangxinloving@163.com

1.2 方法

1.2.1 MCAO 模型制备 参考 Koizumi 等^[2]方法。大鼠麻醉后,仰卧位固定于手术台上,行颈前正中纵行切口,分离暴露右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,剥离迷走神经,结扎颈总动脉近端和颈外动脉根部,在颈总动脉距分叉部约 2 mm 处剪开一小口,将制备好的栓线插入颈总动脉并伸入到颈内动脉内,推进深度约为 18~20 mm,微遇阻力时停止,栓线经过颈总动脉分叉处、颈内动脉进入颅底至较细的大脑前动脉,以阻断来源于同侧颈内动脉、大脑前动脉及大脑后动脉的血流供应,完成对右侧中动脉的阻塞,缺血 2 h 后取出栓线,实现再灌注。

1.2.2 大鼠脑皮质微血管内皮细胞培养 采用陈彬等^[3]方法进行细胞原代培养。

1.2.3 处理因素 ①体内试验,给药组每 3 日腹腔注射麻黄碱一次,对照组注射等体积的生理盐水,共 4 次,12 d 后 SD 大鼠心脏取血检测 TXB₂ 和 6-Keto-PGF_{1α}。②体外试验,SD 大鼠脑皮质微血管内皮细胞培养第 7 日,传代至 6 孔培养板,接种密度为 3 × 10⁷/L,随机分为给药组 3 组(根据体内实验及麻黄碱的药物动力学^[4]培养基麻黄碱的浓度分别是 0.2、0.4 和 0.8 mg/L)和对照组(培养基无麻黄碱),每组 6 孔。加入无血清 M₁₉₉ 培养基培养半 0.5 h 后,2 h 后取培养基检测 6-Keto-PGF_{1α} 的浓度。

1.2.4 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 浓度测定 用放射免疫方法检测血浆 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 浓度及培养基 6-keto-PGF_{1α} 浓度。试剂盒由苏州盛苏州大学血液研究所提供,严格按照试剂盒步骤进行。结果由重庆医科大学附属儿童医院核医学室检测(GC-911-γ 放射免疫计数器,中国科技大学科技实业公司中佳光电仪器分公司)。

统计学处理:用 SPSS 13.0 进行处理分析。检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组均数先行方差齐性检验,各个样本均数的比较先进行方差分析,组与组间采用 SNK-q 检验,正常对照组和模型给药组之间进行 T 检验, $P < 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 大体观察 各组动物在实验过程中进食、活动均无影响,生长发育良好,无中毒症状及死亡。

2.2 大鼠脑微血管内皮细胞培养 显微镜观察分离的微血管段形态各异,长短不等,呈单枝或多枝状(图 1A) 3 d 可见细胞分裂增殖形成散在细胞群落,7 d 融合成片状,细胞紧密排列,互不重叠,呈典型的铺路卵石样结构(图 1B),传代培养细胞形态同原代

培养(图 1C)。原代与第二代内皮细胞进行 VIII 因子相关抗原免疫组化检测,细胞计数 90% 以上细胞的胞浆和核膜周围被染成棕褐色(图 1D),证实培养的内皮细胞为血管内皮细胞。

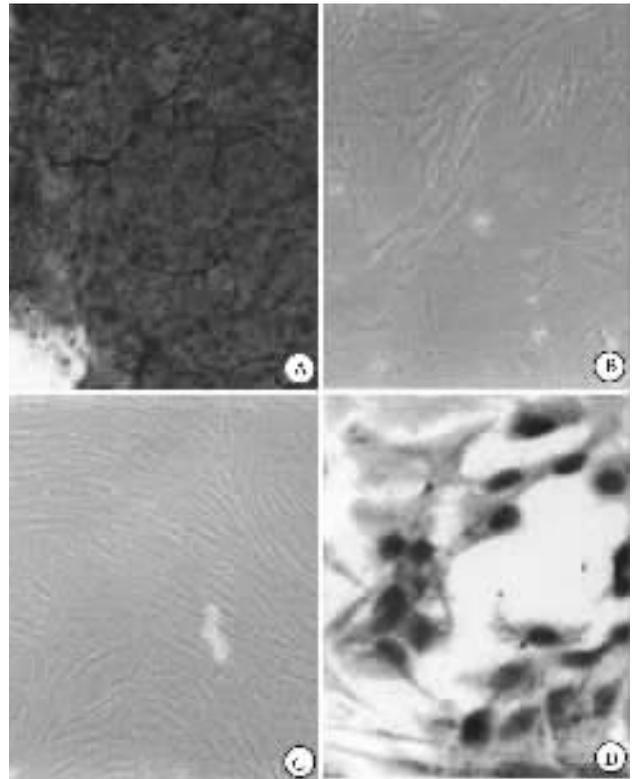


图 1 大鼠脑微血管内皮细胞的培养与鉴定
A 分离的微血管段 ×100 B 培养 3 d 的脑微血管内皮细胞 ×100 C: 培养 7 d 的脑微血管内皮细胞 ×100 D 脑微血管内皮细胞 VIII 因子相关抗原免疫组化 DAB ×400。

图 1 大鼠脑微血管内皮细胞的培养与鉴定

2.3 体内实验 ①正常大鼠:麻黄碱 2 mg/kg 与 4 mg/kg 组 T/P 与正常对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。麻黄碱 8 mg/kg 组 T/P 低于正常对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。② MCAO 模型大鼠:麻黄碱各给药组 TXB₂ 和 T/P 低于模型对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。③ 模型对照组 TXB₂ 与 T/P 高于正常对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 体外试验 麻黄碱各浓度组培养基中 6-Keto-PGF_{1α} 的浓度 (ng/L, 1144.77 ± 33.23, 1126.97 ± 46.34, 1134.55 ± 57.75) 与对照组 (ng/L, 1128.29 ± 56.93) 相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

麻黄 (Ephedra) 是我国宝贵的药用植物,早在

《神农本草经》中就有麻黄治疗中风后遗症的记载。《宣明方》中也有不少以麻黄治疗中风的临床验证。《千金》中指出麻黄能“破癥坚积聚”，有名的小续命

汤即以麻黄为主药。目前仍有不少中医名家善用麻黄组方剂治疗脑梗塞，并且有确切疗效^[5]。

表1 麻黄碱对大鼠 TXB₂、6-keto-PGF_{1α}及 T/P 的影响

(n=6 ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	正常大鼠			MCAO 大鼠		
	TXB ₂	6-keto-PGF _{1α}	T/P	TXB ₂	6-keto-PGF _{1α}	T/P
对照	1340.58 ± 45.88	1318.18 ± 35.88	1.02 ± 0.01	1597.18 ± 60.13	1402.98 ± 40.16	1.14 ± 0.03
麻黄碱 2 mg/kg	1304.43 ± 71.64 ^a	1280.7 ± 86.1 ^a	1.02 ± 0.02	1378.93 ± 50.10 ^a	1374.17 ± 53.30	1.00 ± 0.00 ^a
4 mg/kg	1236.23 ± 67.45 ^a	1235.66 ± 67.12 ^a	1.00 ± 0.02	1329.52 ± 59.98 ^a	1336.27 ± 63.72	1.00 ± 0.01 ^a
8 mg/kg	1119.95 ± 59.91 ^a	1181.58 ± 68.75 ^a	0.95 ± 0.03 ^a	1167.52 ± 32.47 ^a	1185.9 ± 36.19 ^a	0.98 ± 0.02 ^a

^aP < 0.05 vs 对照。

缺血-再灌注损伤时 TXA₂-PGI₂ 平衡失调，可以通过氧自由基^[6]的生成，局部血管收缩、血小板聚集等加重脑和脊髓的再灌注损伤^[7]。Fang 等^[8]发现在脑缺血模型大鼠的血与脑组织中 TXB₂ 明显升高、6-K-PGF_{1α} 升高或不变。通过药物治疗或其他疗法能降低 TXB₂、调节 T/P 的比值，从而达到治疗脑缺血的效果。阎福岭等^[9]就研究发现中药丹参可以通过调节 TXA₂-PGI₂ 平衡减轻脑组织病理损害达到其神经康复作用。本研究体内实验表明，在大鼠脑缺血-再灌注损伤时，MCAO 大鼠血浆中 TXB₂ 浓度及 T/P 高于正常大鼠，TXA₂-PGI₂ 平衡受到破坏。MCAO 伤后引起全身应激反应，通过神经、体液因素使机体释放儿茶酚胺、组织胺、缓激肽等活性物质，通过氧自由基的生成激活磷脂酶 C 产生 TXA₂ 和前列腺素，而血管内皮受损导致 PGI₂ 生成减少，缺血血小板在血管内聚集导致 TXA₂ 生成增加可能是 TXA₂-PGI₂ 平衡受到破坏的原因^[8]。而治疗剂量下的麻黄碱可以减小 T/P 比值，维持 TXA₂-PGI₂ 平衡。麻黄碱的这种作用可能是其对 MCAO 损伤的保护性作用机制之一。

TXA₂ 和 PGI₂ 主要由花生四烯酸经过环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 生成^[10]。PGI₂ 主要在血管内皮细胞产生，而 TXA₂ 主要在血小板产生。本研究体外试验发现，各浓度麻黄碱培养基中 6-Keto-PGF_{1α} 与对照组的差别无统计学意义。在体内，除脑组织外肾脏、肺脏等组织也可以产生 PGI₂^[11]，由此我们推测，麻黄碱对 PGI₂ 的影响可能与各系统有关，而与正常的脑微血管内皮细胞的关系可能不大，但是不排除对损伤的脑微血管内皮细胞存在作用。

TXA₂ 和 PGI₂ 分别通过 TP 受体和 IP 受体发挥作用。它们都是 G 蛋白偶联受体，在中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 和周围神经系统 (peripheral nervous system, PNS) 中都有表达^[12]。虽然

神经元 TP 受体信号传导通路还不是很清楚，但是海马神经元 TP 受体在细胞兴奋及突触传递中起重要作用。突触前 TP 受体活化可以增加谷氨酸的释放。谷氨酸是中枢神经系统中重要的兴奋性神经递质，若细胞外谷氨酸浓度过高可引起强烈的兴奋性神经毒性，导致神经元的肿胀和坏死^[13]，而突触后 TP 受体活化与突触传递的抑制有关^[14]。由此推测，麻黄碱可能是通过影响 MCAO 大鼠血浆 TXA₂-PGI₂ 的平衡，稳定神经细胞的 TP 和 IP 受体，减少谷氨酸的释放，起到对缺血-再灌注损伤大鼠的神经保护作用。

综上所述，①麻黄碱对 MCAO 大鼠血浆 TXA₂-PGI₂ 平衡的维持而起到神经保护作用。②麻黄碱对 PGI₂ 的影响可能与各系统有关，而与正常的脑微血管内皮细胞的关系可能不大，但是不排除对损伤的脑微血管内皮细胞存在作用。③影响 MCAO 大鼠血浆 TXA₂-PGI₂ 的平衡，稳定神经细胞的 TP 和 IP 受体，减少谷氨酸的释放，是麻黄碱神经保护作用的可能途径之一。④本实验为进一步探讨麻黄碱的神经保护作用机制提出了新的研究方向，并且奠定了一定的实验基础。

【参考文献】

- [1] 赵晓科, 肖农, 周江堡, 等. 麻黄碱对脑缺血大鼠运动功能恢复的影响及分子机制研究[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(03): 172-175.
- [2] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: A new experimental model of cerebral embolism in rat which recirculation can be introduced in the ischemic area [J]. Jan J Stroke, 1986, 8: 1-4.
- [3] 陈彬, 罗勇. 大鼠脑微血管内皮细胞的体外培养[J]. 卒中与神经疾病, 2005, 12(02): 80-83.
- [4] 高岭, 李莉, 刘利军, 等. 反相高效液相色谱法测定伪麻黄碱水杨酸盐血药浓度[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(06):

430-432.

- [5] 陆金宝. 重用生麻黄治疗中风后遗症的探索[J]. 上海中医药杂志, 1996, 11(5).
- [6] Matsuo Y, Kihara T, Ikeda M, et al. Role of platelet-activating factor and thromboxane A₂ in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain[J]. Brain Res, 1996, 709(2): 296-302.
- [7] Ichikawa K, Tazawa S, Hamano S, et al. Effect of ozagrel on locomotor and motor coordination after transient cerebral ischemia in experimental animal models[J]. Pharmacology, 1999, 59(5): 257-265.
- [8] Fang YC, Wu JS, Chen JJ, et al. Induction of prostacyclin/PGI₂ synthase expression after cerebral ischemia-reperfusion[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(4): 491-501.
- [9] 阎福岭, 袁真丽, 张博爱, 等. 丹参和光量子化丹参对脑缺血模型 TxA₂/PGI₂ 及脑组织病理的影响[J]. 实用中西医结合杂志, 1997, 10(15): 1426-1427.

- [10] Dogne JM, de Leval X, Hanson J, et al. New developments on thromboxane and prostacyclin modulators part I: Thromboxane modulators[J]. Curr Med Chem, 2004, 11(10): 1223-1241.
- [11] Therland KL, Stubbe J, Thiesson HC, et al. Cyclooxygenase-2 is expressed in vasculature of normal and ischemic adult human kidney and is colocalized with vascular prostaglandin E₂ EP₄ receptors[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(5): 1189-1198.
- [12] Kitanaka J, Hashimoto H, Gotoh M, et al. Expression pattern of messenger RNAs for prostanoid receptors in glial cell cultures[J]. Brain Res, 1996, 707(2): 282-287.
- [13] 岳少杰. 谷氨酸的兴奋性神经毒性作用与中枢神经系统损伤[J]. 国外医学神经病学神经外科学分册, 1994, 21(4): 205-208.
- [14] Hsu KS, Kan WM. Thromboxane A₂ agonist modulation of excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal slice[J]. Br J Pharmacol, 1996, 118(8): 2220-2227.

编辑 王小仲

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)03-0239-01

冷凝集致血液分析仪检测误差报告2例

周利霞 帖彦清 楚伟

(河北省人民医院检验科 河北 石家庄 050051)

【关键词】冷凝集; 血液化学分析/仪器和设备; 误差

【中图分类号】R446.11 【文献标识码】B

1 临床资料

1.1 病例1. 患者,女,54岁,精神分裂症(偏执型),入院时查血常规:WBC $5.50 \times 10^9/L$, Hb 120 g/L, 血小板 $5 \times 10^9/L$, 由于该患者 PLT 数量极低,且临床无任何出血倾向,故再次复查同一份标本的血常规,血小板仍低,为 $4 \times 10^9/L$, 但用该标本推血涂片、常规染色,在低倍显微镜下示血小板成堆分布,数量正常,分析可能是冷凝集致血小板聚集,致使血液分析仪检测血小板出现假性偏低。次日抽血后置 37℃ 温箱,温育 15 min 后检测,同时推血涂片显微镜下观察血小板,血常规结果显示:WBC $5.38 \times 10^9/L$, Hb 120 g/L, 血小板 $184 \times 10^9/L$, 显微镜下血小板散在分布,数量正常。后查患者冷凝集效价高于正常。

1.2 病例2. 患儿,男,7个月龄,因血尿、贫血原因待查入院。住院后查血常规:WBC $17.14 \times 10^9/L$, RBC $1.72 \times 10^{12}/L$, Hb 64 g/L, 血小板 $47 \times 10^9/L$, 因患儿 RBC、Hb 及血小板严重偏低,临床医师嘱其到门诊复查以决定诊治方案。门诊采

血后立即检验,结果为 WBC $14.50 \times 10^9/L$, RBC $2.23 \times 10^{12}/L$, Hb 64 g/L, 血小板 $105 \times 10^9/L$, 考虑患儿体内可能有冷凝集抗体,遂立即将门诊、病房两标本推血涂片,镜下发现门诊标本血小板散在分布,数量正常,而病房标本血小板聚集,成堆分布。患儿冷凝集试验阳性。分析患儿早晨在病房采血,再经标本收集、运送,从抽血至检验最少有 1 h,中间还要经过温度较低的室外,致血液发生冷凝集,而在门诊复查时抽血后立即检验,血液尚未凝集,所以两次结果存在较大差异。为避免冷凝集带来的检测误差,患儿每次作血常规时,抽血后 37℃ 温育 15 min,立即检验。

2 讨论 冷凝集素是一种自身抗体,在受冷后可使血细胞出现凝集^[1],引起血细胞分析仪计数结果误差。急性感染、溶血性贫血、精神分裂症等疾病均可引起冷凝集素的短时升高^[2]。本文中病例1的患者仅凝集了血小板,而病例2的患者的红细胞和血小板都发生了凝集,用血细胞分析仪检测时结果出现了误差。将血液 37℃ 温育 15 min 后检测可排除冷凝集对血液分析仪的干扰,用未经处理的血液和 37℃ 温育后血液推片显示的血小板的分布情况,更加直观的显示了冷凝集素的凝集作用。因此,检验人员在报告血细胞减少时,应十分小心,对可疑病例,除推血涂片核实结果、积极与临床联系外,还应注意排除冷凝集的原因。对可疑冷凝集的病例,应于采血后 37℃ 温育 15 min,立即上机检验。

【参考文献】

- [1] 程鲁京. 寒冷凝集素对血细胞分析干扰的排除[J]. 武警医学院学报, 2000, 9(4): 280.
- [2] 曾德鸿. 冷凝集素临床研究进展[J]. 广西医学, 1998, 20(6): 1077-1080.

收稿日期 2006-10-09; 接受日期 2006-10-25

作者简介:周利霞, 硕士. Tel (0311) 86611221 Email JHL981981@yahoo.com.cn

编辑 王睿