论著

文章编号:1000-5404(2012)23-2360-04

草麻黄中补体抑制单体防治大鼠脑冲击伤的研究

魏林节,冯 华,陈 志,唐卫华,杨云峰,缪洪平,牛 胤,李 兰,朱 刚 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经外科研究所,全军神经创伤防治重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨草麻黄中补体抑制单体(complement inhibiting component in *Ephedra sinica*, CICES)对大鼠脑冲击伤的保护作用。**方法** 用改进的Feeney's法制作大鼠脑冲击伤模型,分为正常组(A组)、颅脑创伤假手术组(B组)、颅脑创伤组(C组)、CICES治疗组(D组),观察打击后生存时间及术后6 h、1、3、7 d神经功能改变,分别检测血清IL-1β、TNF-α、脑组织补体C3水平及脑组织含水量。**结果** D组生存时间及神经功能评分(1、3 d)均优于C组($P<0.05$),D组各检测时间点血清IL-1β、TNF-α浓度(6 h组IL-1β浓度除外)均低于C组($P<0.05$,$P<0.01$),C3补体免疫组化染色结果显示:各检测时间点D组细胞膜外比C组有更少的补体附着($P<0.05$),C组脑组织含水量(1、3、7 d)比D组更显著($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** CICES能够显著减轻脑损伤后的炎性反应,在继发性脑损伤中起到重要的保护作用。

[关键词] 草麻黄中补体抑制单体;白细胞介素-1β;肿瘤坏死因子-α;补体C3;免疫组织化学
[中图法分类号] R285.6; R642.05; R651.1 [文献标志码] A

Complement inhibiting component in *Ephedra sinica* protects rats against traumatic brain injury

Wei Linjie, Feng Hua, Chen Zhi, Tang Weihua, Yang Yunfeng, Miao Hongping, Niu Ying, Li Lan, Zhu Gang (Department of Neurosurgery, Institute of Neurosurgery, Key Laboratory of Neurotrauma Prevention and Treatment, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To determine the protective effects of the complement inhibiting component in *Ephedra sinica* (CICES) after traumatic brain injury (TBI) in rats. Methods Male SD rats were randomly divided into normal control, sham-operation group, TBI group, and CICES treatment group. Modified Feeney's method was used to establish the rat model of experimental TBI with an impact of a weight of 30 g from 20 cm after craniotomy. CICES at 12 mg/kg was given intragastrically once per day for 3 d before the impact, while the rats of TBI group received same volume of normal saline. Survival time was observed and neural function at 6 h, and 1, 3 and 7 d after injury was assessed with Bederson grading system. ELISA was used to test the serum levels of IL-1β and TNF-α. Immunohistochemical staining was used to detect the changes of complement 3 (C3) expression in the brain. The brain water content was measured. Results CICES treatment resulted in longer survival time and higher neurological functional scores than TBI group in 1 and 3 d after injury ($P<0.05$), and lower serum levels of IL-1 and TNF-α (in all time points except for 6 h for IL-1 level) compared with TBI group ($P<0.05$, 0.01). Immunohistochemical assay indicated that there were lesser C3 adhering on cell membrane in CICES treatment group than in TBI group ($P<0.05$). Brain water content (1, 3, and 7 d) was significantly higher in TBI group than in CICES treatment group ($P<0.05$, 0.01). Conclusion CICES significantly reduces the inflammatory reaction after brain injury, and plays an important protective role in secondary brain damage.

[**Key words**] complement inhibiting component in *Ephedra sinica*; IL-1β; TNF-α; complement 3; immunohistochemistry

Corresponding author: Zhu Gang, E-mail: zhugang6666@yahoo.com.cn

颅脑外伤中的重型颅脑创伤的病死率高达30%以上[1]。损伤后C反应蛋白升高导致补体激活-炎症反应-急性反应蛋白-补体激活的恶性循环,加重了继发性脑损伤[2],从草麻黄中纯化出草麻黄中补体抑制单体(complement inhibiting component in *Ephedra sinica*, CICES),初步鉴定为高分子碳水化合物,并证实体外具有良好的补体抑制活性。本实验采用改进的Feeney's法制作大鼠颅脑损伤模型,探讨CICES对脑损伤的保护作用。

[通信作者] 朱 刚, E-mail: zhugang6666@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及主要试剂 体质量 200～250 g 的清洁级健康成年雄 SD 大鼠 269 只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心),草麻黄中补体抑制单体(重庆金麦生物科技有限公司),小鼠抗大鼠 C3 抗体(Santa Cruz 公司),大鼠白介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

1.1.2 动物分组和处理 根据随机数字表分为正常组(A 组)、颅脑创伤假手术组(B 组)、颅脑创伤组(C 组)、CICES 治疗组(D 组),再分为 6 h、1、3、7 d 4 个时相点,其中 A、B 组各 24 只,C、D 组共 221 只。D 组给药剂量为 12 mg/kg,打击前通过灌胃给药,1 次/d,连续 3 d;C 组:同 D 组方法只灌注等量的生理盐水;每天上午 8:30 给药。正常组、假手术组未做任何处理。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的制备 参照 Feeney 等[3]的方法,将 C 组和 D 组大鼠建立实验重型颅脑损伤的模型。用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,颅顶部脱毛和消毒。将大鼠固定于立体定向仪上,正中切开颅,以牙科钻在冠状缝后 3 mm 与矢状缝右侧 3 mm 交会处钻孔,扩大至 6 mm×6 mm(前至冠状缝,左界为矢状缝右旁 2 mm),保持硬膜完整。将质量为 30 g 的圆柱状打击杆(打击端直径 4.5 mm)沿垂直固定于立体定向仪上的套管内自 20 cm 高度释放,打击中心就为钻孔点;用明胶海绵局部止血,至无活动性出血后间断缝合头皮;假手术组只开骨窗,不进行打击。

1.2.2 生存率分析 逐日统计各组死亡大鼠数,绘制大鼠伤后 7 d 内 Kaplan-Meier 生存曲线。

1.2.3 神经功能评分 大鼠造模后 6 h、1、3、7 d 观察神经功能障碍并评分,评分标准采用 Bederson 6 级 5 分法[5]:正常为 5 级(0 分),对侧上肢不能完全伸展为 4 级(1 分),向对侧推时抵抗力下降(置于光滑塑料板子上)为 3 级(2 分),提尾时向向对侧转圈为 2 级(3 分),自动转圈为 1 级(4 分),无自发性活动、意识障碍为 0 级(5 分);假手术组不予评分。

1.2.4 ELISA 检测致伤后各时相点血清 IL-1β、TNF-α 浓度

1.2.4.1 标本收集及处理 各组大鼠在不同时相点神经功能评分后,用 3% 戊巴比妥钠腹腔将大鼠麻醉后,开胸行心脏穿刺抽血,等血清静置 30 min 后,用 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液保存于 -70 ℃冰箱待检测。

1.2.4.2 IL-1β、TNF-α 浓度检测 按 IL-1β、TNF-α 检测试剂盒说明进行,酶标仪上在波长 450 nm 处测光密度值[$D(450)$],以标准品配制浓度与之相对应的 $D(450)$ 值建立标准曲线,根据 $D(450)$ 计算血清中 IL-1β、TNF-α 浓度。

1.2.5 免疫组织化学检测补体 C3

1.2.5.1 取材 将大鼠断头处死后,取出大鼠伤侧大脑组织用 10% 中性甲醛固定。

1.2.5.2 免疫组织化学 按照蜡块切片常规步骤,0.2% 的 H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶活性。小鼠抗大鼠的抗 C3 结合孵育后,洗涤后羊抗小鼠酶标二抗结合,联苯二胺(DAB)显色以后用盐酸乙醇分化、脱水,最后中性树胶封片。

1.2.5.3 测定 C3 阳性反应物平均灰度值 采用 Image Pro-Plus6.0 图像处理软件处理数据,灰度值与阳性反应物的免疫反应强度呈反比关系。

1.2.6 大鼠脑组织的含水量测定 取大鼠大脑组织致伤处约 0.250 g 称湿质量后,将脑组织置于 100 ℃烤箱内烘干 24 h,称其干质量,计算伤处脑组织水含水量。

脑含水量 =(湿质量 - 干质量)/湿质量 ×100%

1.3 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 17.0 统计软件,组间比较行 t 检验,死亡率比较行 Log-Rank 检验。

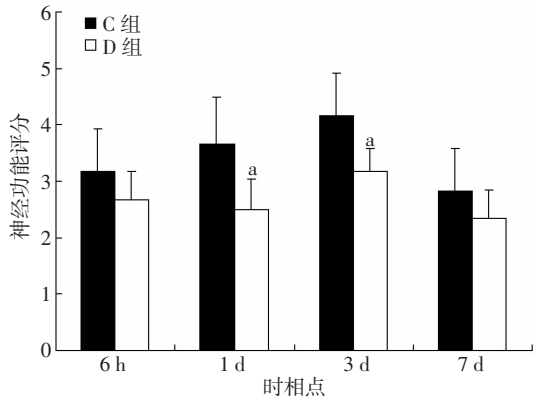
2 结果

2.1 Kaplan-Meier 生存曲线分析

为保证每组有效样本量 6 只,对 C、D 组大鼠进行了模型制作,C 组成功 102 只、D 组成功仅 89 只。A、B 组未出现死亡,C 组与 D 组大鼠死亡主要在伤后 7 d 内,7 d 后少有死亡。因此,采用致伤后 7 d 内计算各组生存情况,C 组死亡 39 只,总体死亡率为 38.25%,而 D 组死亡 20 只,总体死亡率为 22.47%;D 组总体死亡率显著低于 C 组($P<0.05$)。

2.2 大鼠神经功能评分

除 B 组外,C 组与 D 组大鼠在麻醉清醒后均出现一定程度的神经功能障碍症状,D 组大鼠神经功能评分(1、3 d)优于 C 组($P<0.05$,图 1)。



a:$P<0.05$,与 C 组比较

图 1 C、D 组大鼠冲击伤后不同时相点神经功能评分

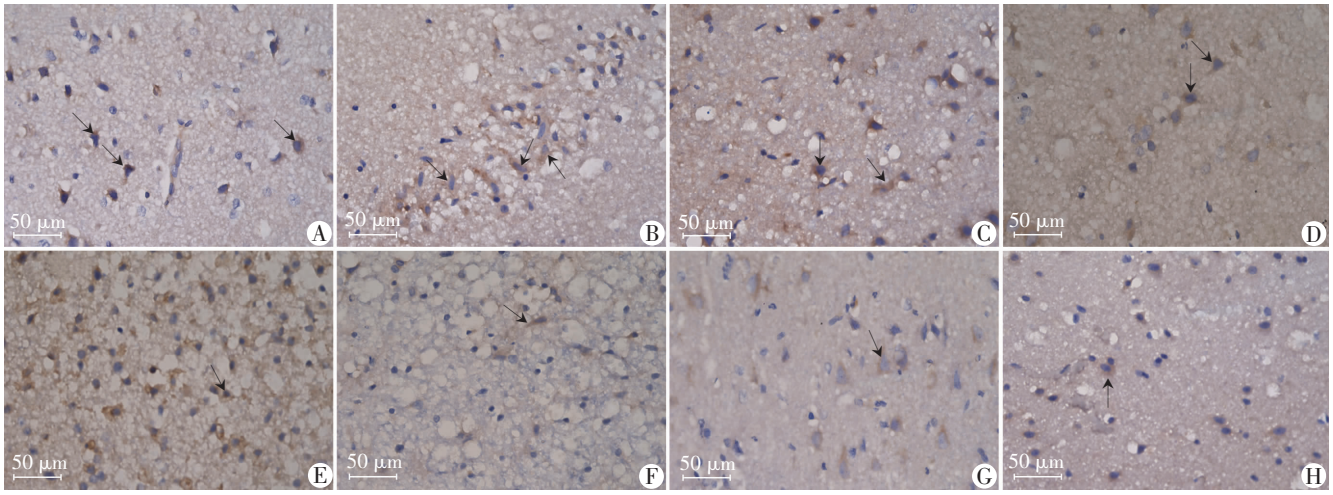
2.3 各组大鼠不同时间血清中 IL-1β、TNF-α 浓度变化

C 组与 D 组大鼠血清中 IL-1β 浓度致伤后 6 h 已升高($P<0.05$),伤后 3 d 达到最高峰($P<0.05$),然后逐渐降低,7 d 时降至伤后 6 h 水平(表 1)。同样,C、D 组大鼠血清中 TNF-α 浓度至伤后 6 h 已升高($P<0.05$),伤后 3 d 达到最高峰($P<0.01$),然后逐渐降低,7 d 时降至比 6 h 水平还低(表 2)。

表 1 各组大鼠不同时间血清中 IL-1β 浓度变化(ng/ml,$n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	1 d	3 d	7 d
A 组	15.69 ± 8.42	15.69 ± 8.42	15.69 ± 8.42	15.69 ± 8.42
B 组	19.19 ± 7.98	25.25 ± 5.46	23.55 ± 5.68	19.00 ± 5.47
C 组	36.91 ± 3.80^{e}	43.16 ± 5.38	62.51 ± 9.92	33.63 ± 3.04^{e}
D 组	33.48 ± 2.73^{cd}	36.72 ± 1.83^{ac}	39.73 ± 7.16^{bc}	23.07 ± 7.97^{ad}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 C 组比较;c:$P<0.05$,与 B 组比较;d:$P<0.05$,e:$P<0.01$,与 3 d 比较



A:C组6 h;B:D组6 h;C:C组1 d;D:D组1 d;E:C组3 d;F:D组3 d;G:C组7 d;H:D组7 d ↑:补体C3

图2 免疫组化观察C、D组大鼠冲击伤后不同时间补体C3阳性表达

表2 各组大鼠不同时间血清中TNF-α浓度变化(ng/ml,$n=6$,$\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	1 d	3 d	7 d
A组	13.85±10.66	13.85±10.66	13.85±10.66	13.85±10.66
B组	33.67±7.08	40.37±6.35	43.07±5.78	26.01±8.17
C组	56.64±2.03^{d}	99.75±8.22	148.47±16.55	50.15±3.27^{d}
D组	38.32±3.49^{bcd}	64.50±5.59^{ac}	95.28±10.81^{ac}	33.85±9.31^{bcd}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与C组比较;c:$P<0.05$,与B组比较;d:$P<0.01$,与3 d比较

2.4 免疫组织化学染色

A组和B组脑组织没有做打击处理,所以未检测补体C3。C组大鼠冲击伤后6 h、1、3、7 d在受伤周围脑组织切片免疫组化染色可见:补体C3大量附着于细胞膜外;而在D组仅有少量C3附着,见图2。图像分析结果:伤后各时间点,D组补体C3灰度值均显著高于C组($P<0.01$)。见表3。

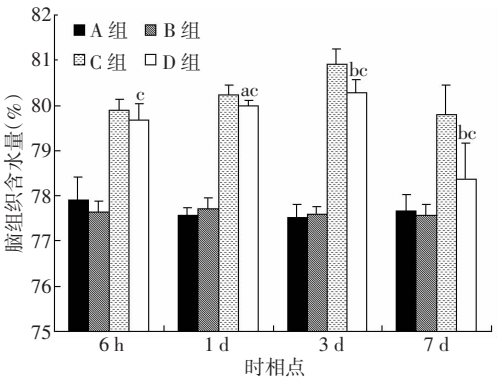
表3 C、D组大鼠冲击伤后不同时间补体C3阳性反应物平均灰度值($n=6$,$\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	1 d	3 d	7 d
C组	93.66±6.28^{b}	84.51±5.33	79.17±5.68	91.55±4.44^{b}
D组	135.12±4.24^{ac}	125.65±5.19^{ac}	100.49±4.57^{a}	124.74±6.21^{ac}

a:$P<0.01$,与C组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与3 d比较

2.5 脑含水量

C和D组脑组织含水量在致伤后6 h已经升高($P<0.01$),3 d达到高峰($P<0.01$),7 d开始下降。在1、3、7 d时,C组脑含水量显著高于D组($P<0.05$,$P<0.01$,图3)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与C组比较;c:$P<0.01$,与B组比较

图3 各组大鼠不同时相点脑组织含水量的变化

3 讨论

脑损伤后补体激活促进了炎症反应进一步激活补体的恶性循环,加重脑损伤[4],研究[5]发现:补体系统激活可对神经元细胞起毒性作用,加重脑组织损害。国内梁丽贞等[6]研究发现,补体C3等的表达变化情况与脑含水量和血脑屏障的破坏程度呈平行关系,是导致血管源性脑水肿和继发性脑损伤的因素之一。孟庆莲等[7]研究发现,C3与颅脑损伤神经功能缺损程度有关。补体抑制剂运用可能减轻脑损伤,防止补体激活对脑组织的第二次损伤有一定的积极作用。中医药学是我国的特色医学,有数千年的应用历史,为我们发现天然补体抑制剂防治脑损伤提供了很好的机会,最近Yong等[8]也从草麻黄中纯化麻黄酸性多糖,并证实体外具有良好的补体抑制活性。

本实验将草麻黄补体抑制单体应用CICES于大鼠颅脑损伤模型,发现该单体对补体有良好的抑制作用,减轻了大鼠脑冲击伤后脑组织的继发性损伤。CICES在体内实验结果提示两种可能[9]:一是CICES通过对后段成分单一靶点的作用实现其对补体双途径的抑制;二是在经典途径和替代途径中均存在作用靶点;CICES对补体的良好的抑制作用,为脑损伤后,减轻脑组织进一步损伤提供了一个药物支持。免疫组化C3表明使用CICES后脑组织补体下降,C3能分解为C3a和C3b,C3a为过敏毒素能使肥大细胞与嗜碱细胞释放组胺,引起血管扩张等作用,加重局部水肿,而C3b更具有广泛的生物学效应,主要的作用是参与补体激活途径中C3转化酶和C5转化酶的形成,进一步激活形成过敏毒性最强的C5a。CICES抑制补体,将产生的更少的C3a与C5a;另外研究表明,IL-1β等炎症因子加重脑水肿[10],国外研究表明补体系统激活能刺激IL-1β、TNF-α分泌增加,一些研究表明,炎症因子的释

放能够加重脑损伤的程度[11]，实验进一步表明没有使用补体抑制剂血清中 IL-1β、TNF-α 浓度也更高；进一步研究[12]表明 CICES 抑制炎症反应和降低补体的作用。

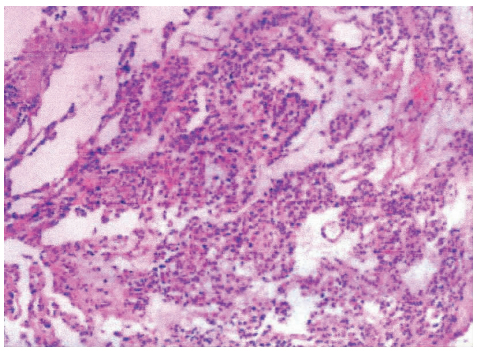
综上所述，CICES 抑制补体系统的激活，减轻了大鼠脑组织的炎症、水肿的发生，进而减轻大鼠创伤后脑组织继发性损伤并促进神经功能的改善。补体激活是一个多环节、多途径的级联反应过程，一个环节受阻均可在一定程度上抑制其活化，减少活性片段产生，从而减轻炎性损害。CICES 可能是通过单一或多靶点抑制补体活化，从而达到补体抑制，发挥保护脑作用。

参考文献：

[1] Myburgh J A, Cooper D J, Finfer S R, *et al*. Epidemiology and 12-month outcomes from traumatic brain injury in australia and new Zealand[J]. J Trauma, 2008, 64(4): 854 – 862.
[2] Nijmeijer R, Lagrand W K, Lubbers Y T, *et al*. C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium[J]. Am J Pathol, 2003, 163(1): 269 – 275.
[3] Feeney D M, Boyeson M G, Linn R T, *et al*. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. Brain Res, 1981, 211(1): 67 – 77.
[4] Rus H, Niculescu F.. The complement system in central nervous system diseases[J]. Immunol Res, 2001, 24(1): 79 – 86.
[5] Xi G, Hua Y, Keep R F, *et al*. Systemic complement depletion diminishes perihematomal brain edema in rats[J]. Stroke, 2001, 32(1): 162 – 167.
[6] 梁丽贞，李长清，吴春丽，等. 补体在大鼠脑缺血-再灌注损伤中的作用[J]. 中华急诊医学杂志，2005，14(3)：219 – 221.
[7] 孟庆莲，牛国忠. 补体 C3、白细胞介素-6 与缺血性脑损伤的关系[J]. 实用神经疾病杂志，2005，8(2)：15 – 16.
[8] Xia Y, Kuang H, Yang B, *et al*. Optimum extraction of acidic polysaccharides from the stems of Ephedra sinica Stapf by Box-Behnken statistical design and its anti-complement activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 282 – 291.
[9] 李军，杨康，白云，等. 草麻黄中补体抑制成分抑制大鼠异种心脏移植超急性排斥反应的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(17)：1773 – 1775.
[10] 陈兵，彭浩，尹延庆，等. 大鼠脑打击伤后脑组织 IL-1β 的表达及药物的神经保护作用[J]. 中国现代医学杂志，2011，20(17)：2570 – 2572，2578.
[11] Li L, Li J, Zhu Y, *et al*. Ephedra sinica inhibits complement activation and improves the motor functions after spinal cord injury in rats[J]. Brain Res Bull, 2009, 78(4/5): 261 – 266.
[12] Hurn P D, Subramanian S, Parker S M, *et al*. T and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(11): 1798 – 1805.

（收稿：2012-06-26；修回：2012-09-13）
（编辑　王小寒）

（上接 2348 页）



CK7(－)、CK5|6(－)、TTF-1(＋＋)、P53(浆＋)、Ki-67(＜5%)、CgA(＋＋)、Syn(＋＋＋)、CD56(＋＋)

图 2　支气管类癌患者右肺中叶组织免疫组化染色结果　(×100)

2　讨论

类癌是神经内分泌肿瘤中组织分化较好、生长缓慢的低度恶性肿瘤，多发生于消化道。1972 年 Arrigoni 按肺类癌的超微结构特点，将其分为典型类癌和不典型类癌两类。2004 年 WHO 制定了典型类癌和非典型类癌的分类标准[2]。支气管肺类癌的发病率低，其类癌组织自黏膜向管腔内突起或隆起，易造成气管狭窄或阻塞，进一步导致肺不张或肺部感染。当出现类癌综合征时，诊断较容易。对于不典型类癌[3]，如不熟悉其组织形态学特征，往往误诊为低分化的其他类型癌。光镜下不典型类癌的癌细胞较小(比小细胞癌的细胞稍大)，常排列呈巢或条索状、小梁状，具有器官样结构，常见有菊形团结构(故可误诊为低分化腺癌)；癌细胞核深染，分裂象多见，癌细胞巢中央常有坏死。细胞巢内有时可见梭形细胞，其边缘细胞亦有呈栅状排列者，间质中可见有淀粉样物质沉着。免疫组化检查有助于与其他低分化肺癌相鉴别，不典型类癌 NSE、chromogranin(CgA)呈阳性，而低分化腺癌与鳞癌均为阴性。电镜观察癌细胞亦见有神经内分泌颗粒，但数量较典型类癌为少，且分布不均，一般在细胞突起为多，细胞器中等量。

非典型类癌的恶性程度介于类癌与小细胞肺癌之间。典型类癌、不典型类癌和小细胞肺癌患者的 5 年生存率约为 95%、65% 及 <5%。传统观点认为类癌为低度恶性疾病，主要以外科手术治疗为主，术后也可以辅助放射治疗；最新研究[4]发现，类癌保肺手术预后好，病死率低。

从临床思维来分析其经验教训可概括为以下 3 点：①临床和病理密切结合才能让病理这一金标准体现应有的价值，临床工作依赖病理但不能迷信病理，当患者的临床表现与病理不符合的时候应该有怀疑的勇气，必要时候给予病理复核或者是重新进行病理学检查；②临床医生应该加强对相关病理知识的学习，小细胞肺癌不等同于神经内分泌癌；③临床诊断甚至于病理学诊断不是诊断的结束，治疗过程中应密切观察患者对治疗的反应，反复验证、不断思考才能最大限度避免漏诊或者误诊、误治。

参考文献：

[1] 刘又宁. 呼吸内科学高级教程[M]. 北京：人民军医出版社，2012：390 – 423.
[2] Beasley M B, Brambilla E, Travis W D. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors[J]. Semin Roentgenol, 2005, 40(2): 90 – 97.
[3] 刘彤华. 诊断病理学[M]. 北京：人民卫生出版社，1994：181 – 183.
[4] Chakraborty A, Mandiyan V, Thayer J, *et al*. A retrospective analysis of survival outcomes and complications of lung sparing surgery in patients with bronchial carcinoid[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185(1 Meeting Abstracts): A5841.

（收稿：2012-07-10；修回：2012-07-26）
（编辑　邓强庭）