

· 临床研究 ·

## 灯盏生脉胶囊干预急性进展性脑梗死的前瞻性研究

毛德军<sup>1</sup>, 宫相聪<sup>2</sup>, 唐咏春<sup>1</sup>, 郭瑞友<sup>1</sup>

(1 青岛大学医学院附属海慈医疗集团神经内科, 青岛 266033;

2 青岛市即墨兰村中心卫生院内科, 即墨 266232)

**[摘要]** 目的:探讨灯盏生脉胶囊对急性进展性脑梗死 (acute progressive cerebral infarction, APCI) 的干预作用及外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 趋化因子受体 1 (CX3C-chemokine receptor 1, CX3CR1)、锌指蛋白 A20 表达的变化。方法:将起病 7 d 以内的 100 例 APCI 患者分为对照组和试验组, 每组各 50 例患者, 所有病例均采用常规治疗, 试验组除常规治疗外还给予灯盏生脉胶囊治疗。分别于入院时、病程 d 7, d 14 和 d 30 检测两组患者 Scandinavian 卒中量表评分 (Scandinavian stroke scale, SSS)、PBMC CX3CR1 及锌指蛋白 A20 表达的变化; 于入院时、病程 d 30 检测两组患者梗死灶体积。结果:对照组病程 d 7, d 14 及 d 30 SSS 均明显低于试验组 ( $P < 0.05$ ); 试验组病程 d 30 梗死灶体积及病程 d 7, d 14 及 d 30 PBMC CX3CR1 的表达均明显低于对照组 ( $P < 0.05$ )。结论:灯盏生脉胶囊可通过下调 PBMC CX3CR1 的表达而改善其预后。

**[关键词]** 灯盏生脉胶囊; 脑梗死; 趋化因子受体 1; 锌指蛋白 A20; 核磁共振成像

**[中图分类号]** R743.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2010)11-0959-04

### Prospective study on treatment of acute progressive cerebral infarction with Dengzhan Shengmai capsule

MAO De-jun<sup>1</sup>, GONG Xiang-cong<sup>2</sup>, TANG Yong-chun<sup>1</sup>, GUO Rui-you<sup>1</sup>

(1 Department of Neurology, the Affiliated Hiser Medical Group of Qingdao University Medical College, Qingdao 266033, China; 2 Department of Internal Medicine, Lanchun Central Hospital of Jimo of Qingdao, Jimo 266232, China)

**[Abstract] Objective:** To determine the effect of Dengzhan Shengmai capsule on acute progressive cerebral infarction (APCI), and the changes of CX3CR1 and the zinc finger protein A20 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Methods:** One hundred patients with APCI, less than 7 d of the onset, were divided into 2 groups ( $n = 50$  for each group). They were treated with routine therapy alone (control) or combined with Dengzhan Shengmai capsule. The changes in Scandinavian Stroke Scale (SSS) were evaluated, and the expression of CX3CR1 and zinc finger protein A20 in PBMC were measured on admission and 7, 14, 30 days after admission. The infarction volume was measured on admission and 30 days after admission. **Results:** SSS at 7, 14 and 30 days was obviously lower in control group than in Dengzhan Shengmai capsule group ( $P < 0.05$ ). The infarction volume at 30 days was smaller, and the expression of CX3CR1 in PBMC was lower in Dengzhan Shengmai capsule group than in control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Dengzhan Shengmai capsule can improve the prognosis of patients with APCI by reducing CX3CR1 expression in PBMC.

**[Key words]** Dengzhan Shengmai capsule; cerebral infarction; CX3CR1; zinc finger protein A20; nuclear magnetic resonance imaging

**[作者简介]** 毛德军, 男, 副主任医师, 主要研究方向为急性脑梗死的基础与临床。联系电话: (0532) 82702908, E-mail: maodejun1962@126.com。

急性进展性脑梗死发病机制目前尚不明确<sup>[1]</sup>, 患者常因脑损害的进一步加重使致残率和死亡率明显增高。为了探讨本病的防治方法, 我们采用了前

瞻性、双盲、成组设计的研究方法研究了 100 例急性进展性脑梗死 (acute progressive cerebral infarction, APCI) 患者病程中外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 趋化因子受体 1 (CX3C-chemokine receptor 1, CX3CR1)、锌指蛋白 A20 表达的变化及灯盏生脉胶囊的干预作用, 现报告如下。

## 对象与方法

### 1 病例选择

本院 2007 年 5 月 - 2009 年 5 月期间病程 < 24 h 的连续性急诊住院的 793 例急性脑梗死 (acute cerebral infarction, ACI) 患者参加研究筛选。从筛选对象中选择符合 1995 年全国脑血管病学术会议制定的诊断标准<sup>[2]</sup>和符合 Davalos 等<sup>[3]</sup>制定的 APCI 诊断标准患者 100 例, 分为对照组和试验组, 每组各 50 例患者。试验组因药物不良反应退出 1 例。

患者入组标准: 病程 < 7 d, 年龄 50 ~ 75 岁。符合 1995 年全国脑血管病学术会议制定的诊断标准<sup>[2]</sup>和 Davalos 等<sup>[3]</sup>制定的 APCI 诊断标准。

患者或家属知情同意。

病例排除标准: 短暂性脑缺血发作 (transient ischemic attack, TIA) 或病程 7 d 后 ACI 复发者。

入院时随机血糖 > 11.1 mmol·L<sup>-1</sup>, 血压 > 180/110 mmHg 或颈内动脉超声检查斑块狭窄 > 60%。

肺部感染或发热。颅脑 CT 或 MRI 检查发现出血、水肿或占位效应。24 h 入量 < 1 500 mL 或应用脑血管扩张药物者。既往有脑梗死、神经退行性变、心肌病、急性冠状动脉综合征、结缔组织病、恶性肿瘤或自体免疫病。近期应用免疫抑制剂或抗炎药物。拒绝签署知情同意书或临床资料不全者。本研究符合中国国家食品药品监督管理局制定的伦理学标准, 所有受试对象或其亲属在治疗前均签署知情同意书。

### 2 APCI 的诊断标准<sup>[3]</sup>

起病 24 h 内 Scandinavian 卒中量表评分<sup>[4]</sup> (Scandinavian stroke scale, SSS) 中意识评分或运动评分降低 2 分或语言评分下降 3 分为早发性进展性脑梗死 (early progressive cerebral infarction, EPCI), 24 h ~ 7 d 间出现以上评分下降之一者为晚发性进展性脑梗死 (late progressive cerebral infarction, LPCI)。

### 3 研究设计与给药方案

参与筛选的 793 例 ACI 患者入院时均采用常规治疗: 阿托伐他汀钙片 20 mg·d<sup>-1</sup> (连用 30 d), 阿司匹林肠溶片 0.2 g·d<sup>-1</sup> (连用 30 d); 自入院之日起符合 APCI 诊断标准<sup>[3]</sup>者计入本研究病例。

试验组: 50 例 APCI 患者在常规治疗基础上加服灯盏生脉胶囊 (云南生物谷灯盏花药业有限公司生产, 0.18 g·粒<sup>-1</sup>, 国药准字 Z20026439) 1.08 g·d<sup>-1</sup>, 连用 30 d。对照组: 50 例 APCI 患者在常规治疗基础上加服安慰剂 (云南生物谷灯盏花药业有限公司生产), 连用 30 d。

### 4 观察指标

4.1 SSS 评分 患者的观察严格遵医嘱在急诊、病房住院期间或门诊随访。两组患者的 SSS 评分分别于入院时、病程 d 7, d 14 和 d 30 评分 1 次。

4.2 梗死灶体积 两组患者分别于入院时和病程 d 30 进行颅脑 MRI 检查, 梗死灶体积的计算采用多田提出的病灶体积计算公式<sup>[6]</sup>,  $T = 1/6 \pi \times (\text{长轴}) \times S (\text{短轴}) \times \text{Slice} (\text{层面数})$ 。

4.3 锌指蛋白 A20 表达 入院后次日、病程 d 7, d 14, d 30 采集标本检测锌指蛋白 A20 表达分析的变化。

4.4 CX3CR1 检测 入院后次日、病程 d 7, d 14, d 30 采集标本检测 CX3CR1 的变化。

### 5 标本采集与检测

两组患者于入院后次日、病程 d 7, d 14 及 d 30 清晨空腹肘静脉采血 25 mL, 22 mL 肝素抗凝; 另取 3 mL 静脉血室温下 1 500 ~ 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 分离血清。

### 6 流式细胞仪锌指蛋白 A20 表达分析

分别向测定管和同型对照管加入血液 200 μL, 加入红细胞裂解 A 液各 625 μL, 振荡混匀; 加入 B 液各 265 μL, 振荡混匀。250 g·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 去上清, 以磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 同法洗涤细胞沉淀 1 次。加入破膜剂 A 液 100 μL, 室温固定 15 min; 以 PBS 液同法洗涤细胞沉淀 1 次; 加入破膜剂 B 液 100 μL。5 min 后于测定管加入 A20 单克隆抗体 20 μL, 室温放置 25 min。之后, 于测定管、同型对照管各加入山羊抗小鼠 IgG-FITC 20 μL, 室温避光放置 25 min。以 PBS 液同法洗涤细胞沉淀 1 次, 并重悬于 1 mL PBS 中。测定时以前向散射光/侧向散射光 (former scattering of light/side scattering of light, FS/SS) 作图, 同型对照调零, 分析

测定管 PBMC 锌指蛋白 A20 表达 (荧光强度 % )。

### 7 流式细胞仪 CX3CR1 检测

取患者外周血 20 mL, 用淋巴细胞分离液 2 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心, 分离人血 PBMC, D-Hanks 液洗涤 3 次; 利用经明胶和自身血浆处理的塑料平皿收集贴壁的 PBMC<sup>[5]</sup>。加入 DMEM 培养基 (美国 Sigma 公司) 制成细胞悬液, 调整细胞数为  $1 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ , 用 Giemsa 和非特异酯酶染色检查, PBMC 纯度大于 95%, 台盼蓝拒染试验活细胞大于 97%。取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 加入 30  $\mu\text{L}$  抗 CX3CR1-PE 抗体于 1.5 mL EP 管中, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min; 洗液洗涤 3 次后, 以 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞, 维持 4  $^{\circ}\text{C}$  立刻上机检测 CX3CR1

表达 (荧光强度 % )。

### 8 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件包处理实验数据。计数资料采用  $\chi^2$  检验, 两样本间的计量资料比较采用  $t$  检验, 对于重复测量资料采用具有重复测量资料的方差分析。  $P < 0.05$  为差异有显著意义。

## 结 果

### 1 患者基线资料比较

**1.1 两组患者入院时基线资料比较** 两组患者入院时的基线资料比较差异无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ ), 见表 1。

表 1 两组患者入院时一般资料比较

项 目	对照组 ( $n=50$ )	试验组 ( $n=49$ )	<sup>2</sup> 或 $t$ 值	$P$
男性 / $n$ (%)	27 (54)	28 (56)	0.105	0.740
年龄 / 岁	64 $\pm$ 5	64 $\pm$ 4	1.09	0.284
入院时间 / h	11.8 $\pm$ 2.8	12.1 $\pm$ 3.1	0.503	0.639
SSS/分	34.5 $\pm$ 4.4	35.4 $\pm$ 5.3	0.3	0.827
高血压病 / $n$ (%)	24 (48)	23 (47)	0.01	0.950
糖尿病 / $n$ (%)	26 (52)	25 (51)	0.01	0.950
高血脂症 / $n$ (%)	10 (20)	9 (18)	0.07	0.780
收缩压 / mmHg	152.68 $\pm$ 26.56	153.54 $\pm$ 25.14	0.165	0.874
舒张压 / mmHg	88.45 $\pm$ 16.07	90.24 $\pm$ 17.56	0.526	0.557
随机血糖 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	6.8 $\pm$ 1.5	6.9 $\pm$ 2.1	0.272	0.781
Fib / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	4.87 $\pm$ 1.56	5.12 $\pm$ 1.64	0.774	0.458
hsCRP / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6.2 $\pm$ 2.7	6.5 $\pm$ 3.1	0.511	0.612

Fib: 纤维蛋白原; hsCRP: 超敏 C 反应蛋白

**1.2 两组患者进展时基线资料比较** 两组进展时 SSS 及进展时间比较无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ ), 见表 2。

### 2 两组患者 SSS 比较

对照组患者 SSS 于病程 d 7, d 14 和 d 30 均低于试验组, 差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 见表 3。

表 2 两组 APCI 患者进展时 SSS 和进展时间比较

组 别	例数	SSS/分	进展时间 / h
对照组	50	25.1 $\pm$ 2.9	67.4 $\pm$ 3.7
试验组	49	27.5 $\pm$ 3.4	59.6 $\pm$ 3.4
$t$ 值		0.908	0.784
$P$		0.348	0.434

表 3 两组 APC 患者 SSS 比较

分

组 别	例数	入院时	d 7	d 14	d 30
对照组	50	34.5 $\pm$ 4.4	22.0 $\pm$ 10.8	22.8 $\pm$ 11.5	26.2 $\pm$ 11.9
试验组	49	35.4 $\pm$ 5.3	27.9 $\pm$ 11.2 <sup>b</sup>	28.5 $\pm$ 12.3 <sup>a</sup>	31.3 $\pm$ 13.1 <sup>a</sup>
$F$ 值		3.17	102.55	38.96	57.84
$P$		0.251	0.008	0.025	0.016

与对照组比较: a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ 。下同。

### 3 两组患者梗死灶体积的比较

两组患者入院时梗死灶体积对比无统计学意义

( $P > 0.05$ ); 病程 d 30 试验组明显低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

表 4 两组患者梗死灶体积的比较

组别	例数	梗死灶体积 /cm <sup>3</sup>	
		入院时	d 30
对照组	50	4.12 ±3.37	7.78 ±4.12
试验组	49	4.08 ±4.15	6.07 ±3.79 <sup>a</sup>
t值		0.052	2.138
P		0.973	0.034

表 5 两组患者 PBMC CX3CR1、PBMC胞核锌指蛋白 A20p65表达 (荧光强度, MnX)的比较

组别	n	CX3CR1 (MnX)				锌指蛋白 A20 (MnX)			
		入院时	d 7	d 14	d 30	入院时	d 7	d 14	d 30
对照组	50	45.2 ±15.0	61.0 ±16.4	42.4 ±14.2	11.5 ±8.0	13.9 ±4.7	7.9 ±4.5	5.5 ±3.1	3.1 ±2.1
试验组	49	47.5 ±15.0	53.4 ±15.8 <sup>a</sup>	36.0 ±13.8 <sup>a</sup>	8.0 ±7.5 <sup>a</sup>	14.5 ±5.3	8.6 ±5.1	5.9 ±3.7	3.5 ±2.5
F值		1.96	41.23	35.89	34.61	1.53	1.72	1.45	3.76
P		0.454	0.025	0.035	0.039	0.584	0.482	0.587	0.408

#### 4 两组患者 PBMC CX3CR1及锌指蛋白 A20表达的比较

试验组患者病程 d 7, d 14, d 30 PBMC CX3CR1表达的变化均明显低于对照组 (P < 0.05), 差异均有统计学意义; 两组患者各期锌指蛋白 A20表达比较无差异 (P均 > 0.05), 见表 5。

### 讨 论

体外试验证实, Fractalkine (FKN) 趋化单核细胞、T淋巴细胞的聚集, 并激活小胶质细胞, 小胶质细胞中的 CX3CR1 被激活后可通过诱导钙离子内流、激活促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和蛋白激酶 B/Akt 激酶等信号转导途径进行信号传导, 诱导炎症及神经细胞凋亡<sup>[7]</sup>。Nishi 等<sup>[8]</sup>多数学者认为, 脑缺血后脑组织局部生成的趋化因子及其受体, 尤其是 FKN/CX3CR1, 引起过度的炎症反应, 加重缺血脑组织损伤, 在脑缺血损伤的发生发展中发挥了不容忽视的作用。锌指蛋白 A20 在肿瘤细胞 TNF-α 应答研究中被发现, 后来却被证实它是一种天然的炎症保护蛋白, 其诱导后瞬时表达是机体炎症时的一种内源性保护机制<sup>[9]</sup>。国内学者推测<sup>[10]</sup>, 急性脑梗死发病后炎症细胞内 NF-κB 的活化激发了锌指蛋白 A20 的高表达, 表达的锌指蛋白 A20 反过来以“反馈式”机制抑制细胞内 NF-κB 的活化, 干预细胞合成和分泌性细胞因子的表达如 TNF-α, IL-1, IL-6 等。

本研究中病程 d 7, d 14 和 d 30 对照组 SSS 均较试验组明显降低, 试验组患者病程 d 7, d 14, d 30 PBMC CX3CR1 的表达及病程 d 30 梗死灶体积均明显低于对照组, 两组患者各期锌指蛋白 A20 表达比较无差异, 表明灯盏生脉胶囊可通过下调 CX3CR1 表达干预 APCI 的进展, 而与锌指蛋白 A20 的保护机制无关, 此与陈彪等<sup>[11]</sup>的临床研究结论相符; 但本试验病例数较少, 且缺少 APCI 患者前后循环的对比, 故此结论尚需随机、双盲、多中心的大宗病例

的研究进一步印证。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 李红云, 纪晓军, 裴海涛, 等. 进展性缺血性卒中 [J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2005, 13(2): 132 - 135.
- [2] 王新德执笔. 各类脑血管疾病诊断要点 [J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379.
- [3] DAVALOSA, TONY D, WENS F, et al. Neurological deterioration in acute ischemic stroke: potential predictors and associated factors in the European cooperative acute stroke study (ECASS) I [J]. *Stroke*, 1999, 30(7): 2631 - 2636.
- [4] LINDENSTROM E, BOYSEN G, CHRISTIANSEN LW, et al. Reliability of Scandinavian Stroke Scale [J]. *Cerebrovasc Dis*, 1991, 1(4): 103 - 107.
- [5] FREUDLICH B, AVDALOVIC N. Use of gelatin/plasma coated flasks for isolating human peripheral blood monocytes [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 62(5): 31 - 37.
- [6] 多田. CT 上乙脑内血肿 9 测定 [J]. 神经外科, 1981, 9(11): 251 - 254.
- [7] HUGHES PM, BOTHANM MS, FRENZEL S, et al. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS [J]. *Glia*, 2002, 37(4): 314 - 327.
- [8] NISHI T, MAIER CM, HAYASHI T. Superoxide dismutase 1 over expression reduces MCP-1 and MIP-1 alpha expression after transient focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(10): 1312 - 1324.
- [9] ARVELO MB, COOPER JT, LONGO C, et al. A20 protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide acute toxic lethal hepatitis [J]. *Hepatology*, 2002, 35(3): 535 - 543.
- [10] 吴丽娟, 杨清武, 王琳, 等. 急性脑梗死患者 PBMC 锌指蛋白 A20 表达及其与 TNF-α 和 IL-6 的相关性 [J]. 重庆医学, 2008, 37(3): 227 - 231.
- [11] 陈彪, 方向华, 吴永浩, 等. 灯盏生脉胶囊对缺血性脑卒中二、三及防治效果 [J]. 中华神经科杂志, 2008, 3(3): 195 - 200.

编辑: 况扶华 接受日期: 2010 - 05 - 04