

hST3Gal I 基因细胞系,为进一步研究 hST3Gal I 基因产物细胞膜连 $\alpha 2,3$ 唾液酸含量增加与乳腺癌细胞侵袭和转移潜能的调控提供实验基础。

参考文献

- 1 Hakomori S:Glycosylation difining cancer malignancy:new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci USA*,2002,99(16):10231-10233
- 2 Schauer R. Achievement and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J*,2000,17(7-9):485-499
- 3 Paula A Videira, Manuela Correia, Nadia Malagolini, *et al.* ST3Gal I sialyltransferase relevance in bladder cancer tissues and cell lines. *BMC Cancer*,2009,9:357-372
- 4 Joy Burchell, Richard Plulaom, *et al.* An $\alpha 2,3$ sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas. *Glycobiology*, 1999,9(12):1307-1311
- 5 Lloyd K O, Burchell J, Kudryashov V, *et al.* T & Taylor - papadimitriou J. Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *J Biol Chem*,1996,271(52):33325
- 6 Lityn'ska A, Przybyto M, Pochec' E, *et al.* Comparison of the lectin-binding pattern in different human melanoma cell lines. *Melanoma Res*,2001,11(3):205-212
- 7 Inagaki Y, Tang W, Guo Q, *et al.* Sialoglycoconjugate expression in primary colorectal cancer and metastatic lymph node tissues. *Hepato-gastroenterology*,2007,54(73):53-57
- 8 De Albuquerque Garcia Redondo P, Nakamura CV, de Souza W, *et al.* Differential expression of sialic acid and N-acetylglactosamine residues on the cell surface of intestinal epithelial cells according to normal or metastatic potential. *J Histochem Cytochem*,2004,52(5):629-640
- 9 Joy Burchell, Arron Mungul, *et al.* O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy. *Jorunal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*,2001,6(3)355-363
- 10 Dimitroff CJ, Pera P, Dall'olio F, *et al.* Cell surface N-acetylneuraminic acid $\alpha 2,3$ galactoside-dependent intercellular adhesion of human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*,1999,256(3):631-636
- 11 Chefalo P, Pan y, Nagy N, Guo Z, Harding CV. Efficient metabolic en-

- gineering of GM3 on tumor cells by N-phenylacetyl-D-mannosamine. *Biochemistry*, 2006,45(11):3733-3739
- 12 Miyagi T, Wada T, Yamaguchi K, *et al.* Sialidase and malignancy: a mini-review. *Glycoconj J*, 2004, 20(3):189-198
- 13 Baba'l P, Janega P, Cerna' A, *et al.* Neoplastic transformation of the thyroid gland is accompanied by changes in cellular sialylation. *Acta Histochem*,2006,108(2):133-140
- 14 Ferna'ndez - Rodrl'guez J, Feijoo - Carnero C, Merino - Trigo A, *et al.* Immunohistochemical analysis of sialic acid and fucose composition in human colorectal adenocarcinoma. *Tumour Biol*,2000,21(3):153-164
- 15 Chen S, Fukuda M. Cell type-specific roles of carbohydrates in tumor metastasis. *Methods Enzymol*,2006,416:371-380
- 16 Ciolczyk - Wierzbicka D, Gil D, Hoja - Lukowicz D, *et al.* Carbohydrate moieties of N-cadherin from human melanoma cell lines. *Acta Biochim Pol*,2002,49(4):991-999
- 17 Chang WW, Yu CY, Lin TW, *et al.* Soyasaponin I decreases the expression of $\alpha 2.3$ -linked sialic acid on the cell surface and suppresses the metastatic potential of B16F10 melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*,2006,341(2):614-619
- 18 Pinho S, Marcos NT, Ferreira B, *et al.* Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer Lett*,2007,249(2):157-170
- 19 Sperandio M, Frommhold D, Babushkina I, *et al.* $\alpha 2,3$ -sialyltransferase-IV is essential for L-selectin ligand function in inflammation. *Eur J Immunol*,2006,36(12):3207-3221
- 20 Mandal C, Srinivasan GV, Chowdhury S, *et al.* High level of sialate-O-acetyltransferase activity in lymphoblasts of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL): enzyme characterization and correlation with disease status. *Glycoconj J*,2009,26:(1):57-73
- 21 Kean EL, Munster - Kuhnel AK, Gerardy - Schahn R. CMP sialic acid synthetase of the nucleus. *Biochim Biophys Acta*,2004,1673(1-2):56-65
- 22 Chen CL, Lee WL, Tsai YC, *et al.* Sialyltransferase family members and cervix squamous cell carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*,2002,23(60):514-518
- 23 Dall'olio F, Chiricolo M. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J*, 2001,18(11-12):841-850

(收稿:2010-05-20)

补肾强肝活血法对缺血再灌注大鼠 RBC、HGB 及骨髓有核细胞计数的影响

张 鹤 张英强 梅建伟

摘 要 目的 通过回春偏瘫方对缺血再灌注大鼠的实验研究,探讨防治脑卒中偏瘫的作用机制。**方法** 采用改良的 Lon-

基金项目:四川省科技厅自然科学重点攻关项目(2006z08-007)

作者单位:610000 成都誉美医院(张鹤、梅建伟);成都中医药大学(张英强)

通讯作者:张英强,电子信箱:zyq369963@yahoo.com.cn

ga 法建立大鼠左侧大脑中动脉梗阻 (MCAO) 再灌注模型,造模成功后随机分为假手术组,模型组,西药尼莫地平组,回春偏瘫方高、中、低剂量组,治疗 14 天后股静脉取血检测外周血 HGB 含量及 RBC 计数,取股骨骨髓进行骨髓涂片及检测核细胞计数。**结果** MACO 再灌注大鼠经灌服回春偏瘫方治疗后,各治疗组外周红细胞数目、血红蛋白含量和骨髓有核细胞数目均有所增加,其中外周红细胞数目和骨髓有核细胞数目的增加较为明显,高剂量组和中剂量组可明显升高血红蛋白含量,疗效优于西药组。3 个剂量治疗组均可明显升高骨髓有核细胞数量,疗效优于西药组。3 个剂量治疗组升高外周红细胞数目的疗效与西药组相当。**结论** 回春偏瘫方具有促进 MCAO 再灌注后大鼠神经功能恢复的一定作用。

关键词 脑卒中偏瘫 补肾强肝活血法 回春偏瘫方 缺血再灌注 RBC、HGB 骨髓有核细胞计数

Effects of Bushenqiangganhuoxue Therapy on RBC, HGB and Karyote Medullares Count in Ischemia – reperfusion Rats. Zhang He, Zhang Yingqiang, Mei Jianwei. Yumei Hospital of Chengdu, Sichuan 610075, China

Abstract Objective To explore the mechanism of preventing and curing hemiplegia with Huichunpian prescription through experiment in ischemia – reperfusion rats. **Methods** Model of left middle cerebral artery obstruction (MCAO) was established by the method of modified Longa. After that, the rats were randomly divided into sham operation group, model group, western medicine (nimodipine) group, and three Huichunpian prescription groups (high, medium and low dose). Fourteen days after treatment, blood HGB content and RBC count were detected, and femur bone marrow slides and karyote medullares count were also performed. **Results** After MCAO ischemia – reperfusion rats were treated by Huichunpian prescription, blood HGB content, RBC count and karyote medullares count of all rats in three Huichunpian prescription groups increased, with the latter increasing more. High and medium dose of Huichunpian prescription could increase HGB content obviously and the effect was superior to western medicine group. Three doses of Huichunpian prescription increased karyote medullares count obviously and the effect was superior to western medicine group. The effect of increasing RBC count in three doses of Huichunpian prescription was similar to western medicine group. **Conclusion** Huichunpian prescription play a role in promoting nerve functional recovery in ischemia – reperfusion rats.

Key words Palsy; Bushenqiangganhuoxue therapy; Huichunpian prescription; Ischemia – reperfusion; RBC, HGB; Karyote medullares count

脑卒中正在呈高发趋势,而偏瘫作为脑卒中主要后遗症之一,给社会和家庭造成沉重的经济和精神负担。祖国医学治疗脑卒中偏瘫多以气虚血瘀为主,治疗主要宗王清任补阳还五汤^[1]。本课题组认为该病病机多属肝肾亏虚为本,瘀血阻络为标,提出补肝肾强肾活血法为基本治疗大法,并根据这一辨证思维,自拟回春偏瘫方运用于临床,疗效确切^[2]。现就该方对缺血再灌注大鼠进行实验研究报道于下。

材料与方法

1. 实验材料:(1)实验动物:SD 大鼠:一级动物,体重 280 ± 20 g,雌雄各半,共 50 只,合格证号为川实动管质 SCXK(川)2007-19,由成都中医药大学实验动物中心提供,检疫备用。(2)实验用药:①回春偏瘫方组成:龟板胶 10g、三七 10g、熟地黄 20g、山茱萸 15g、川牛膝 15g、川芎 15g、鸡血藤 10g、菟丝子 10g、枸杞子 10g、杜仲 10g。中药材由四川中药材公司提供。中药原液由成都中医药大学附属医院药剂科配制(原药材煎煮,去渣留液,浓缩成每毫升药液含原生药 4g 为高剂量组浓度,再分别稀释成每毫升药液含原生药 2g 作为中剂量组浓度,以及每毫升药液含原生药 1g 作为低剂量浓度;②尼莫地平片,郑州瑞康制药有限公司提供,国药准字 H41022175,规格 20 毫克/片。按 1mg/ml 配制水溶液;③硫酸庆大霉素注射液,乐山三九长征药业股份有限公司提供,批号:20071102。(3)实验试剂:①戊巴比妥钠盐(沃凯),国药集团化学试剂有

限公司提供,批号:68020183;临用前用生理盐水配成 0.3% 溶液;②无水乙醚,汕头西陇化工厂提供,批号:070324;③75% 乙醇,成都蜀都实业有限公司提供,批号:2007. 10. 01;④0.9% 氯化钠注射液,四川科伦药业股份有限公司提供,批号:80710290 和 A071210D;⑤2% 碘酊,四川天康制药有限公司提供,国药准字 H51020611。(4)实验仪器:①电子分析天平仪 Sartorius AG 德国产;②数显水浴恒温振荡器 SHZ-B,上海跃进医疗器械厂生产,产品注册号:沪药管械(准)字 2001 第 1410826 号,标准号:Q-BKYY141-2000;③生物显微镜(BX-51TF),日产 OLMPUS,SN:4E26412;④显微摄像系统,日产 OLMPUS CKX41SF;⑤图像分析系统:Leica Qwin V3.2.0, Leica 公司。

2. 实验方法:(1)模型建立:①动物筛选:普通级健康 SD 大鼠,体重 280 ± 20 g,雌雄各半,共 50 只;②造模方法:左侧大脑中动脉梗阻(MCAO)再灌注模型的制备,采用改良的 Longa 法建立 MCAO 模型^[3];③模型成功判断及纳入标准(神经行为学评分法):SD 大鼠常常在再灌注术后约 1~2h 完全苏醒。在大鼠清醒后用改良 Berdson 分别观察其神经和行为学变化^[4]。按如下方法评分,凡评分 ≥ 2 分者说明造模成功纳入本实验。具体评分分级方法如下描述。a. 一般情况差,活动减少,倦屈。计为 1 分;b. 提鼠尾观察前肢屈曲情况,如双前肢对称伸向地面,计为 0 分,如手术对侧前肢出现腕屈曲计为 1 分,肘屈曲计为 2 分,肩内旋计为 3 分,既有腕屈曲和(或)肘

屈曲,又有肩内旋者,计为4分;c.将动物置于平地面上,分别推双肩向对侧移动,检查阻力。如双侧阻力对等且有力,计为0分,如向手术对侧推动时阻力下降者,根据下降程度不同分为轻、中、重3度,分别计为1、2和3分;d.将动物双前肢置一金属网上,观察双前肢的肌张力。双前肢肌张力对等且有力者计为0分。同样根据手术对侧肌张力下降程度不同计为1、2和3分;e.动物有不停地向一侧转圈者,计为1分。根据标准评分,满分为12分,分数越高,表示动物行为障碍越严重。

(2)动物分组:除假手术组外,大鼠MCAO的模型建立成功后,采用随机数字表法将其分为5组即模型对照组,西药对照组,中药高剂、中剂、低剂量组。(3)给药方法:大鼠用药等效剂量按成人临床日用量与体重折算系数比,计算出相当于高、中、低剂量的用药量。尼莫地平为12mg/(kg·d),回春偏瘫方用中药机熬制成汤剂。每天灌胃1次,术后当日即用药。假手术组及模型组按同样方法予以等容量生理盐水灌胃。一共用药14天。

(4)观察指标及方法:①外周血红细胞及血红蛋白计数:实验最后1天处死大鼠前,取每组大鼠的股静脉血,交与成都中医药大学附属医院住院部检验科检测外周血细胞中的红细胞计数、血红蛋白含量。每只鼠所采血量不少于1ml,用抗凝试管接取,混合颠倒10次以上摇匀送检;②骨髓有核细胞的测定方法:实验最后1日,每组随机取出6只大鼠经颈部脱臼法处死,从6只大鼠中各取1根完整股骨,用10ml 3%的冰醋酸通过6.5号针头将骨髓液尽量全部冲出,再使细胞通过带4.5号针头的注射器使细胞充分分散,用血球计数板计数有核细胞,四个大方格的细胞总数 $\times 2.5 \times 10^4$ 即为1根股骨的细胞总数。(5)统计学方法:所有各组数据均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对所得数据用SPSS13.0统计软件进行分析,组间计量资料比较采用单因素方差分析,计数资料采用秩和检验。检验水准为双侧 $\alpha = 0.05$,即 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠用药后外周血红蛋白和红细胞计数比较:结果如表1所示:①与假手术组比较:造模后的各组大鼠的红细胞计数和血红蛋白的含量均有所下降,尤其是各组的红细胞计数均明显低于假手术组,有极显著差异($P < 0.01$),模型组血红蛋白含量极明显低于假手术组,有极显著差异($P < 0.01$),西药组与回低组血红蛋白含量也明显低于假手术组,有显著差异($P < 0.05$);②与模型组比较,治疗各组的红细胞计数均极明显地高于模型组,有极显著差异性($P < 0.01$),同时回高组和回中组血红蛋白含量也明显高于模型组,有显著差异性($P < 0.05$);③4个治疗组之间外周红细胞计数和血红蛋白含量的无明显差异性($P > 0.05$)。结果显示造模后的各组大鼠外周红细胞和血红蛋白含量均有所下降,经过治疗该指标有所恢复,回春偏瘫方各治疗组都可以增加外周红细胞

和血红蛋白的含量,但是各治疗组的治疗效果在统计学上未见明显差异性(图1、图2)。

表1 用药14天后各组大鼠外周红细胞计数和血红蛋白含量的比较

分组	n	HGB(g/L)	RBC($\times 10^{12}/L$)
假手术组	6	153.13 $\pm$ 14.11	7.78 $\pm$ 0.24
模型组	8	112.57 $\pm$ 18.62 ^{▲▲}	5.37 $\pm$ 0.30 ^{▲▲}
西药组	8	130.67 $\pm$ 15.53 [▲]	6.32 $\pm$ 0.25 ^{▲▲**}
回高组	8	136.00 $\pm$ 17.24 [*]	6.57 $\pm$ 0.24 ^{▲▲**}
回中组	8	136.00 $\pm$ 24.59 [*]	6.57 $\pm$ 0.35 ^{▲▲**}
回低组	8	131.00 $\pm$ 15.65 [▲]	6.34 $\pm$ 0.21 ^{▲▲**}

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

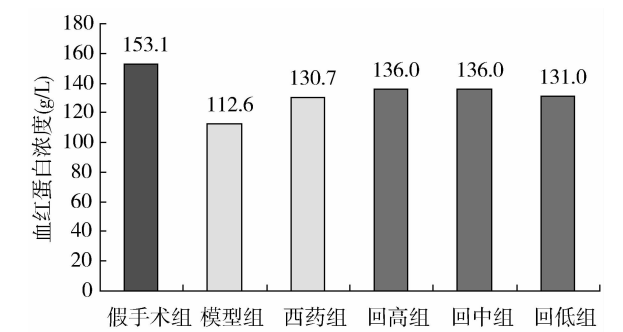


图1 用药14天后各组大鼠HGB比较

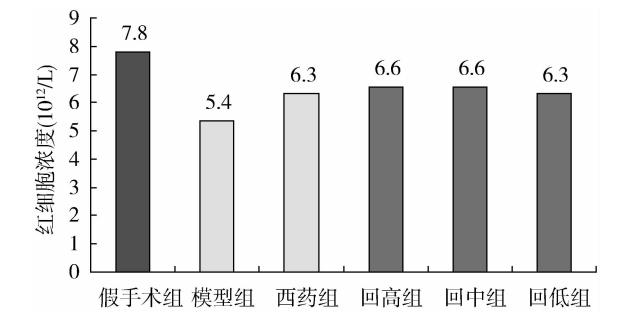


图2 用药14天后各组大鼠RBC比较

2. 各组大鼠用药后骨髓有核细胞计数比较:结果如表2所示:①与假手术组比较:造模后的各组大鼠的骨髓有核细胞数量均有所下降,有极著差异($P < 0.01$);②与模型组比较,回春偏瘫方治疗各组的骨髓有核细胞计数均明显地高于模型组,有显著差异性($P < 0.01$),但西药组未见明显的骨髓有核细胞的增高,与模型组无明显差异性($P > 0.05$);③与西药组比较:回春偏瘫各治疗组骨髓有核细胞计数明显高于西药组,有显著差异性($P < 0.01$);④回春偏瘫方三个治疗组之间骨髓有核细胞计数无明显差异性($P >$

0.05)。结果显示,造模后各组大鼠骨髓有核细胞的含量均有下降,通过治疗发现,回春偏瘫方可以增加大鼠骨髓有核细胞数量,而西药组对骨髓有核细胞含量的影响不明显(图3)。

表2 用药14天后各组大鼠骨髓有核细胞计数比较($\times 10^4$ /股骨 mm^3)

分组	n	骨髓有核细胞计数
假手术组	6	97.00 $\pm$ 5.34
模型组	8	61.30 $\pm$ 3.52 [▲]
西药组	8	64.32 $\pm$ 5.47 [▲]
回高组	8	80.61 $\pm$ 7.13 ^{▲▼}
回中组	8	79.62 $\pm$ 8.32 ^{▲▼}
回低组	8	75.26 $\pm$ 3.87 ^{▲▼}

与假手术组比较,▲ $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.01$;与西药组比较,▼ $P < 0.01$

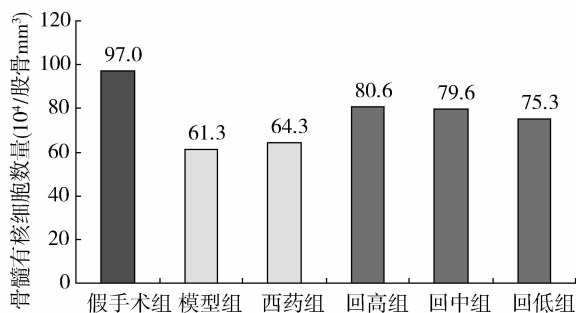


图3 用药14天后各组大鼠骨髓有核细胞计数比较

讨 论

血液成分是影响缺血性脑血管疾病发生发展和转归的重要因素^[5]。由于红细胞约占全血容量的一半,红细胞血液流变学特性,如血细胞比容、红细胞变形能力(ED)及红细胞凝集对微循环组织灌注、输送氧到组织十分重要^[6]。红细胞主要功能最直接的体现是运输氧和二氧化碳,血液通过微循环,在血液和组织液之间进行物质交换,维持机体新陈代谢和生命活动^[7]。微循环毛细血管直径很小,最小的只有3~4 μm ,红细胞直径约7.5 μm ,当红细胞在全身血管中循环运行时,要多次经过这些口径比它小的毛细血管和血窦孔隙,必须经过变形才能通过,从而保证微循环的正常灌注。全血黏度高,主要取决于红细胞的变形性。血液在大、中血管内流动的速度较快、红细胞在其中随血液流动时成为有利于流动的扁平的椭圆形,可以降低血液黏度,减少外周阻力,增加血流量,增加心排出量^[8]。脑血管疾病患者常伴有血液流变学异常,血液流变学因素与微循环之间有密切联系^[9]。在红细胞变形能力良好的条件下,脑组织可

耐受较低的血流灌注。红细胞变形能力降低导致组织缺血缺氧,影响脑血管疾病的病理变化和演变过程,也是机体尤其是脑组织衰老的原因之一^[10]。卒中病人的CBF在一定范围内随病人红细胞压积和黏度的增大而减少。

骨髓在正常情况下是唯一产生红细胞、粒细胞和血小板的场所,骨髓也产生淋巴细胞和单核细胞^[11]。骨髓有核细胞指的是骨髓细胞中含有细胞核的细胞,骨髓细胞中除了成熟红细胞和血小板其余的细胞都有细胞核。骨髓造血象主要观察成熟红细胞与有核细胞的大致比例,以确定增生度。有核细胞越多,说明骨髓细胞增生程度越高。MCAO再灌注大鼠经灌服回春偏瘫方治疗后,外周红细胞和血红蛋白的含量都增加,同时大鼠骨髓有核细胞数量也增加。其中回高组和回中组对于外周红细胞和血红蛋白的含量都明显高于模型组。而西药组对外周红细胞、血红蛋白和骨髓有核细胞含量无明显影响。这些实验测试初步证实补肾强肝活血法可提高MCAO再灌注大鼠RBC、HGB和骨髓有核细胞含量,对于血液运行和营养功能有一定程度上的改善。

参考文献

- 周仲瑛. 中医内科学(新世纪全国高等中医药院校规划教材). 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327
- 任培清. 回春偏瘫方治疗中风偏瘫肝肾亏虚型的实验研究. 四川中医, 2009, 27(10): 11
- 帕尔哈提·热西提, 更·党木仁加甫, 汪永新, 等. 改良线栓法制作大鼠局灶性脑缺血模型[J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(2): 145-147
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke, 1986, 17(3): 472-476
- 王丽萍. 选择性血液成分稀释法治疗缺血性脑血管病患者疗效观察. 中国危重病急救医学, 1999, 11(9): 566-566
- 师春玲. 心脑血管疾病患者血脂与红细胞变形性关系的探讨. 山西医药杂志, 2009, 38(1): 47-48
- 赵颖. 张建荣. 杨芝红. 全血细胞分析在缺血性脑血管疾病中的临床意义. 宁夏医学杂志, 2006, 28, (1): 33-35
- 江应浩. 贫血和心脑血管疾病患者血沉方程K值的检测分析. 微循环学杂志, 2005, 15(2): 79-79
- 刘荣格. 疏血通对急性脑梗死血流变学的影响. 临床合理用药杂志, 2010, 4: 73-74
- 张丹凤, 夏向南. 老年高血压病患者经不同方法治疗后的血液流变学指标变化. 微循环学杂志, 2010(1): 35-36
- 张圣旭. 缺血性脑血管病患者骨髓间充质干细胞的实验研究. 中国误诊学杂志, 2008, 8(22): 5293-5295

(收稿: 2010-05-24)

(修回: 2010-05-27)