

增高和术后血压波动大等因素有关,是威胁患者生存和影响预后的重要因素。本组有 53 例术后复查 CT,再出血率为 13.2%,术后再出血者多为初期开展此类手术的患者,多见于入院时出血量较大,收缩压 > 190mmHg,术后血压控制不佳者。针对上述特点,笔者对后期手术患者采取一些相应的防范措施:①进入血肿腔后只吸除血肿,避免吸除血肿腔边缘的脑组织而引起新的出血;②术中避免反复牵拉脑组织来探查和清除血肿,清除血肿不宜过快,用低吸引力缓慢清除血肿,待血肿腔内压力下降,周围血肿自然向血肿腔中央推移后再继续缓慢清除,避免损伤脑组织而出现新的出血点;③血肿清除干净后对于血肿腔内的出血点必须可靠止血,即使无活动渗血也不急于关颅,继续观察 10min 左右,明确是否有活动渗血或下陷的脑组织是否复胀;④术中麻醉和复苏要平稳,避免血压波动过大,术后收缩压控制在 150mmHg 以下。通过上述措施本组后期 26 例手术患者术后再出血 1 例,再出血发生约率为 3.84%,较初期明显减少。同时,笔者认为由于高血压脑出血术后血肿残留及再出血仍时有发生,术后应常规在血肿腔内放置引流管以备术后引流用。对于血肿腔内无明显渗血者不要过多填入明胶海绵等止血材料,以免影响术后血肿残留及再出血者血肿的溶解和引流。

参考文献

- 1 Kanaya H, Yukawa H, Itoh Z, *et al.* Grading and indications for treatment of ICH of basal ganglia (Co-operative study in Japan) [M]. Berlin:Springer-Verlag, 1980:268-274
- 2 只达石. 实用临床神经外科学 [M]. 北京:科学技术文献出版社, 2009:559-567
- 3 Kanaya H, Kuroda K. Development in neurosurgical approaches to hypertensive intracerebral hemorrhage in Japan [M]. New York:Raven Press, 1992:197-210
- 4 张帆, 游潮. 高血压脑出血手术治疗的研究进展 [J]. 中国脑血管病杂志, 2010, 7(4):210-214
- 5 王凯, 潘秀平, 雪亮. 脑出血手术方法探讨与治疗进展 [J]. 中国临床神经外科杂志, 2008, 13(12):764-766
- 6 Ramnarayan R, Anto D, Anilkumar TV, *et al.* Decompressive hemi-cranectomy in large putaminal hematomas; an Indian experience [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2009, 18(1):1-10
- 7 Shimamura N, Munakata A, Naraoka M, *et al.* Decompressive hemi-cranectomy is not necessary to rescue supratentorial hypertensive intracerebral hemorrhage patients; consecutive single-center experience [J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 111(1):415-419
- 8 Chen SC, Feng G. Clinic investigation and logistic analysis of risk factors of recurrent hemorrhage after operation in the earlier period of cerebral hemorrhage [J]. Acta Neurochir Suppl, 2005, 95(1):119-121

(收稿:2012-02-21)

(修回:2012-03-05)

柴胡皂苷 - d 对大鼠肝癌细胞 H4 - II E 细胞内 Ca^{2+} 的影响研究

秦 勇 陈念平 叶冠雄 徐胜前 吴成军 王 世 潘德标

摘 要 **目的** 探讨柴胡皂苷 - d (saikosaponin - D, SS - D) 诱导大鼠肝癌细胞 H4 - II E 细胞内钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) 变化的影响研究。**方法** 通过噻唑蓝 (MTT) 比色实验选择合适的药物浓度、荧光指示剂 Fluo - 3/AM 检测 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 及钙库中 Ca^{2+} 的变化。**结果** MTT 比色结果显示, 10、30、50、70、100 μ mol/L SS - D 对细胞的存活率都在 90% 以上。第一大组中阴性对照组可引起细胞内钙离子浓度升高, 其平均荧光强度 (MFI) 为 35.76 ± 1.37 ; 阳性对照组可使其大幅度升高, 其 MFI 值为 74.74 ± 1.26 。不同浓度的 SS - D 也可使其不同程度升高, 并且与 SS - D 呈浓度依赖性, 其平均荧光强度 (MFI) 分别为 59.95 ± 1.02 、 73.89 ± 1.35 、 80.30 ± 0.04 、 93.30 ± 0.83 。阳性对照组及处理组的 MFI 值明显高于阴性对照组 ($P < 0.05$); 处理组 1、处理组 3 及处理组 4 MFI 值与阳性对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 石胆酸 (LCA) 及 SS - D、熊脱氧胆酸 (UDCA) 都能诱导细胞钙库中 Ca^{2+} 释放。**结论** SS - D 能诱导细胞内 Ca^{2+} 内流, 增加 $[Ca^{2+}]_{cyt}$, 调控细胞内 Ca^{2+} 的生理活动。

关键词 柴胡皂苷 - d 钙离子 H4 - II E 细胞 细胞内钙离子浓度

作者单位: 323000 浙江省丽水市人民医院普通外科 (秦勇、叶冠雄、徐胜前、吴成军、王世、潘德标); 524001 湛江, 广东医学院附属医院肝胆外科 (陈念平)

Effect of Saikosaponin - d on Intracellular Ca^{2+} Concentration of H4 - IIE Rat Liver Cells. Qin Yong, Chen Nianping, Ye Guanxiong, et al. General Surgery of the People's Hospital of Lishui, Guangdong 323000, China

Abstract Objective To investigate the influences of saikosaponin - d (SS - D) on the free cytoplasmic concentration of Ca^{2+} in H4 - IIE cells of rat models. **Methods** Proper concentration of chemicals used in the study was assessed by thiazol blue (MTT) method. Changes in free cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) and intracellular stores Ca^{2+} were measured by Fluo - 3/AM load technique. **Results** MTT test showed that cell survival rates were all over 90% after treatment of SS - D at the concentration of 10, 30, 50, 70, 100 and 120 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The negative control group showed a increase of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ with mean fluorescence intensity (MFI) of 35.76 ± 1.37 , and the increase was even more obvious in the positive control group, which showed MFI of 74.74 ± 1.26 . For other groups, the MFI of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was 59.95 ± 1.02 , 73.89 ± 1.35 , 80.30 ± 0.04 , 93.30 ± 0.83 , respectively, showing an SS - D dose - dependent increase. MFI were significantly higher in positive control group and the treatment group than that in the negative control group ($P < 0.05$). There was also significant differences in the MFI between treatment group 1, 3, 4 and that in the positive control group ($P < 0.05$). SS - D, LCA and UDCA can induce the release of Ca^{2+} from intracellular stores. **Conclusion** SS - D may regulate physiological activities of intracellular Ca^{2+} by increasing $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ level since it can induce Ca^{2+} influx.

Key words SS - D; Ca^{2+} ; H4 - IIE cell; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$

胆汁酸可通过诱导内质网(ER)中 Ca^{2+} 的释放和(或)钙内流,改变细胞内钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$),来加强或抑制胆汁沿着胆道系统进行排泄,调节肝细胞一系列生理功能^[1-3]。我国中药柴胡在临床应用中发挥不同的作用,柴胡皂苷是柴胡的主要化学成分,Yang 等研究发现 10 $\mu\text{mol/L}$ 柴胡皂苷(I)能诱导大鼠胰腺腺泡细胞内钙库中 Ca^{2+} 释放,增加细胞内 Ca^{2+} 浓度,随后又出现胞外 Ca^{2+} 内流,再次增加胞内 Ca^{2+} 浓度^[4-6]。而在随后的研究中证实,柴胡皂苷(I)通过与大鼠胰腺腺泡细胞膜受体的相互作用转导刺激信号,使 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ 先后两次达到峰值,从而持续加强柴胡皂苷(I)的促酶分泌功能。日本学者 Kodama 等^[7]对 C6 型大鼠神经胶质瘤细胞的研究中发现 10 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 柴胡皂苷 - d 可诱导细胞内钙库中 Ca^{2+} 释放,使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高。综合上述学者的研究,柴胡皂苷 - d 可调控细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化,但能否诱导肝细胞系内 Ca^{2+} 浓度的变化在国内少见报道,本实验在细胞水平上探讨 SS - D 对 H4 - IIE 细胞内 Ca^{2+} 浓度变化影响作用。

资料与方法

1. 细胞株:大鼠肝癌细胞株 H4 - IIE 购自上海拜力生物科技有限公司。

2. 试剂和仪器:DMEM 培养基(广州威佳公司),石胆酸、熊脱氧胆酸(Sigma 公司),柴胡皂苷 - d(南昌贝塔公司),Fluo - 3/AM 荧光探针(香港先进技术公司)。

3. 细胞培养:大鼠肝癌细胞株 H4 - IIE 接种于含 10% 胎牛血清、100U/L 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 DMEM 高糖培养基中,在 37℃、饱和湿度、5% CO_2 培养箱中常规培养,每 1 ~ 2 天换液传代培养。传代时将原培养液吸出,加入 0.25% 胰蛋白酶溶液消化 45s 后,加入 5ml 左右的新培养液终止消化,然

后用培养液吹打制成细胞悬液后传代或接种。

4. 实验分组:第一组:处理组为柴胡皂苷 - d 样品液加入培养液中,终浓度分别为处理组 1 (30 $\mu\text{mol/L}$)、处理组 2 (50 $\mu\text{mol/L}$)、处理组 3 (70 $\mu\text{mol/L}$)、处理组 4 (100 $\mu\text{mol/L}$),同时每个处理组都加入终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 石胆酸(LCA);空白对照组:加入与处理组相同体积完全培养液(大鼠肝癌细胞 H4 - IIE);阴性对照组:终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ LCA 加入与处理组相同体积培养液中;阳性对照组:终浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 熊脱氧胆酸(UDCA)与终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ LCA 同时加入与处理组相同体积培养液中。第二组又分别设立空白对照组、终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 LCA 为阴性对照组、300 $\mu\text{mol/L}$ 的 UDCA 为阳性对照组及 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 SS - D 为处理组。

5. 噻唑蓝(MTT)比色实验:取对数生长期生长良好的 H4 - IIE 肝癌细胞以 6×10^3 /孔的密度接种于 96 孔培养板,每组设 5 个平行孔,培养箱中培养 12h 后(待完全贴壁),换含有不同浓度的柴胡皂苷 - d 及对照组的 H4 - IIE 肝癌细胞培养液,继续培养 12h 后,后进行 MTT 染色分析

6. 荧光指示剂 Fluo - 3/AM 结合流式细胞仪测定细胞内钙离子浓度:①将浓度为 5×10^5 个/毫升的 H4 - IIE 肝癌细胞接种于培养基中,培养 24h 后换液,第一组及第二组各实验组同时作用细胞 12h 后,无 Ca^{2+} 的 D - Hank's 离心洗涤 1000r/min $\times 5\text{min} \times 3$ 次,弃上清液,收集细胞 $(2 \sim 3) \times 10^6$ 个细胞;②第一组避光加入 1ml 终浓度为 2.4mmol/L 的 Ca^{2+} 及 5 $\mu\text{mol/L}$ 荧光染料 Fluo - 3/AM 孵育缓冲液悬浮细胞;37℃、5% CO_2 的培养箱中避光孵 1h;③第二组避光先加入 1ml 无 Ca^{2+} 、pH 值为 8.8、终浓度为 20mmol/L 的乙二醇双四乙酸(EGTA)及 5 $\mu\text{mol/L}$ 荧光染料 Fluo - 3/AM 孵育缓冲液悬浮细胞;37℃、5% CO_2 的培养箱中避光孵育 1h。选用各实验组作用于大鼠肝癌细胞株 H4 - IIE 12h 后,按照试剂盒上的说明书结合流式细胞仪检测 H4 - IIE 细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。

7. 统计学方法:实验结果以均数标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有

实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件分析。对照组与各处理组的比较采用方差分析中最小有意义差异法 (LSD) 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

结 果

1. 噻唑蓝 (MTT) 比色实验选择药物实验浓度: 不同浓度的 SS - D 处理 H4 - II E 肝癌细胞 12h 后, SS - D 对肝癌细胞的抑制作用不大, 最大抑制率不超过 11.12%; 说明 10 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ SS - D 对细胞的生长无明显影响 (表 1)。SS - D 不同浓度时细胞的存活率见表 1, 为避免药物浓度过大所致的细胞毒性作用, 应选择对细胞生长无明显影响即细胞存活率在 90% 以上的浓度。

表 1 柴胡皂苷 - d 组对 H4 - II E 肝癌细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	OD 值	存活率 (%)
对照组		0.8208 ± 0.0517	
柴胡皂苷 - d 组	10	$0.7810 \pm 0.0323^{\Delta*}$	94.95
	30	$0.7730 \pm 0.0296^{\Delta*}$	93.94
	50	$0.7676 \pm 0.0229^{\Delta*}$	93.25
	70	$0.7610 \pm 0.0204^{\Delta*}$	92.92
	100	$0.7622 \pm 0.0344^{\Delta*}$	92.57
	120	$0.7702 \pm 0.0234^{\Delta*}$	88.88

与对照组比较, $*P < 0.05$; 与 120 $\mu\text{mol/L}$ 柴胡皂苷 - d 组比较, $\Delta P < 0.05$

2. 荧光指示剂 Fluo - 3/AM 测定细胞内钙离子浓度: 分析结果以 1 万个细胞平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 表示细胞内钙离子的相对含量, 结果显示第一大组中阴性对照组处理 H4 - II E 细胞 12h 后可引起细胞内 Ca^{2+} 的 MFI 升高, 阳性对照组可使细胞内 Ca^{2+} 的 MFI 大幅度升高, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。处理组也可使细胞内钙离子的 MFI 不同程度升高, 并且与 SS - D 呈浓度依赖性, 与阴性对照组比较有差异 ($P < 0.05$)。处理组 1、处理组 3、处理组 4 与阳性对照组比较有差异 ($P < 0.05$), 并且与 SS - D 呈浓度依赖性。第二大组中阴性、阳性及处理组都能使细胞内 Ca^{2+} 的 MFI 增加, 说明 SS - D、LCA 及 UDCA 都能诱导钙库中钙离子释放到胞质中。

3. 流式细胞仪图观察各实验组 Ca^{2+} 的变化情况: 图 1 中 A、B、D、E、F、G 各波峰代表进入区域的荧光数目, 横线代表荧光强度; A 组未见进入荧光强度区域内的波峰, G 及 C 组也可见不同程度进入荧光强度区域内的波峰, 而随着处理组浓度的增加, 进入横线区域的波峰也增多, 说明荧光强度及量呈不同程度

增加 (图 1)。

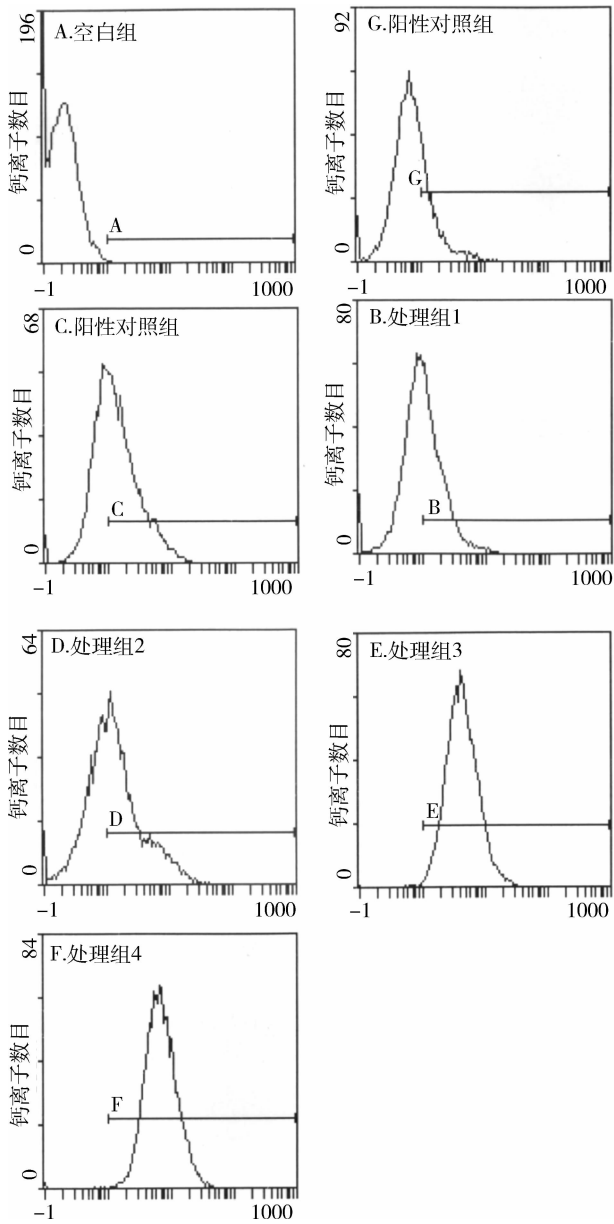


图 1 石胆酸、熊脱氧胆酸、柴胡皂苷 - d 对 H4 - II E 细胞内钙离子浓度的影响

讨 论

钙离子是细胞内的主要第二信使, 参与调控许多细胞和组织的生理活动, 近期研究胆汁酸对大鼠肝癌细胞 H4 - II E 和原代正常的鼠肝细胞的作用, 发现 UDCA 及其他的利胆胆汁酸, 能诱导内质网钙库中 Ca^{2+} 释放, 激活 Ca^{2+} 内流^[3,8]。而预培养 12h 的 LCA 及其他淤胆胆汁酸也可诱导内质网钙库中 Ca^{2+} 释放, 但抑制 Ca^{2+} 内流, 利胆胆汁酸牛磺脱氧胆酸 (TDCA) 与淤胆胆汁酸 LCA 同时行细胞培养 12h 后, 细胞内 Ca^{2+} 浓度明显升高, 这提示 TDCA 能抵消预培

养 12h 的 LCA 对钙池操作性钙通道 (SOC) 的抑制作用,说明利胆胆汁酸能中和淤胆胆汁酸对细胞的毒害作用^[3]。柴胡皂苷 - d 是柴胡化学成分中最具有活性的成分,能否诱导肝细胞系内 Ca^{2+} 的变化,在国内研究甚少^[4]。

本实验通过 30 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 柴胡皂苷 - d (SS - D) 加 50 $\mu\text{mol/L}$ LCA 作为处理组、UDCA 加 LCA 作为阳性对照组及 LCA 作为阴性对照组同时孵育大鼠肝癌细胞 H4 - II E 12h 后,结果显示 LCA 可引起 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高,UDCA 可使其大幅度升高,不同浓度的 SS - D 也可使其不同程度升高,并且与 SS - D 呈浓度依赖性,而 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 LCA, 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 UCDA 及 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 SS - D 作用于大鼠肝癌细胞 H4 - II E 12h 后都能使 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 增加,说明 SS - D 与利胆胆汁酸具有相同作用,而有研究在胆汁淤积症鼠模型中证实,利胆胆汁酸能预防胆管细胞受损,维持其正常的功能活动^[9]。又有研究表明,肝细胞内胞质中游离 Ca^{2+} 浓度的升高是由于胞外 Ca^{2+} 内流和胞内钙库中 Ca^{2+} 的释放所致,而这又是胆管收缩,促使胆汁酸沿着胆小管移动的必需的部分机制。而 SS - D 对乙醇损伤大鼠肝细胞研究表明,SS - d 能增强机体抗氧化防御能力^[10]。抑制自由基的产生,促进肝细胞增殖,防止肝细胞损伤和坏死。这更进一步说明 SS - D 可能通过影响细胞内 Ca^{2+} 变化来刺激胆汁流量,在分子水平上减少氧自由基的产生,从而起到保护肝细胞内能量代谢、减轻肝脏损伤的作用。

综上所述,结合本次实验,是否可推测 SS - D 可能作为一种“天然的利胆药”,在胆汁淤积症中或肝内外胆道梗阻解除的情况下,通过诱导细胞内钙库中 Ca^{2+} 的释放来提高胞质中钙离子浓度,加强胆汁排泄。但 SS - D 在调控细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化是否与膜上的钙信号通路有关,值得更进一步研究。

参考文献

- 1 Lau BW, Colella M, Ruder WC, *et al.* Deoxycholic acid activates protein kinase C and phospholipase C via increased Ca^{2+} entry at plasma membrane[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128 (3): 695 - 707
- 2 Gerasimenko JV, Flowerdew SE, Voronina SG, *et al.* Bile acids induce Ca^{2+} release from both the endoplasmic reticulum and acidic intracellular calcium stores through activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 40154 - 40163
- 3 Aromataris EC, Castro J, Rychkov G, *et al.* Storeoperated Ca^{2+} channels and stromal interaction molecule 1 (STIM1) are targets for the actions of bile acids on liver cells[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2008, 1783 (5): 874 - 885
- 4 史群云, 高丽丽. 柴胡的研究现状[J]. *医护论坛*, 2009, 6 (3): 158 - 159
- 5 Yang WX, Yu Y, Zhang WZ, *et al.* Inhibitory role of GDP on saikosaponin (I) stimulated enzymes secretion and rising of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ in rat pancreatic acini[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22 (7): 669 - 672
- 6 Yu Y, Yang WX, Wang H, *et al.* Characteristics and mechanism of enzyme secretion and increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ in Saikosaponin(I) stimulated rat pancreatic acinar cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8 (3): 524 - 527
- 7 Kodama Y, Xiaochuan L, Tsuchiya C. Dual effect of saikogenin D; *in vitro* inhibition of prostaglandin E2 production and elevation of intracellular free Ca^{2+} concentration in C6 rat glioma cells[J]. *Planta Med*, 2003, 69 (8): 765 - 767
- 8 Joel C, Edoardo C, Grigori Y, *et al.* A small component of the endoplasmic reticulum is required for store - operated Ca^{2+} channel activation in liver cells; evidence from studies using TRPV1 and tauro - deoxycholic acid[J]. *Biochem J*. 2009, 418: 553 - 566
- 9 Marco M, Heather F, Antonio B, *et al.* Ca^{2+} - dependent cytoprotective effects of ursodeoxycholic and tauroursodeoxycholic acid on the biliary epithelium in a rat model of cholestasis and loss of bile ducts[J]. *American Journal of Pathology*, 2006, 168, (2): 398 - 409
- 10 李素婷, 周晓慧, 杨鹤梅, 等. 柴胡皂苷 - d 对乙醇损伤原代培养大鼠肝细胞的保护作用[J]. *承德医学院院报*, 2007, 24 (4): 352 - 354

(收稿: 2011 - 09 - 16)

(修回: 2011 - 11 - 28)

血液透析通路使用现状及更换次数影响因素分析

梁世凯 赵 湘

摘 要 **目的** 了解维持性血液透析患者的通路应用现状,探讨影响通路更换的因素。**方法** 统计 2010 年 1 月 1 日 ~ 2011 年 6 月 30 日期间笔者区院 124 例维持性血液透析患者的临床资料、通路更换次数,分析影响更换次数的因素。**结果** 124 例患

作者单位: 310014 杭州, 浙江省人民医院肾内科

通讯作者: 赵湘, 电子信箱: zhaoxiang7 - 7@163.com