

血脂异常是冠心病发生与发展的危险因素之一,监测血脂水平对治疗冠心病与预防病情进展有重要意义。本研究结果显示,观察组疗效及各项血脂指标的改善均优于对照组($P < 0.05$),提示将益气活血通脉汤用于治疗老年冠心病心绞痛患者具有实用性及可行性。

综合上述,采用益气活血通脉汤联合西药治疗老年冠心病心绞痛患者效果显著,可有效控制病情。但是本研究观察时间较短,远期效果尚需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 高芳,郭灵祥,高向东,等. 中西医结合治疗冠心病心绞痛 32 例临床观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(8): 1046- 1047.
- [2] 中华中医药学会. 中医内科常见病诊疗指南(西医疾病部分)冠心病心绞痛[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011,

9(18): 143- 145.

- [3] 罗水泉. 益气活血通脉汤治疗冠心病心绞痛临床观察[J]. 中国中医急症, 2014, 23(7): 1368- 1369.
- [4] 赵忱,赵志强,王强,等. 中医药治疗冠心病心绞痛的作用机制概述[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(5): 588- 589.
- [5] 张正伟. 益气活血方治疗冠心病心绞痛临床观察[J]. 中医临床研究, 2014, 6(32): 94, 96.
- [6] 庞晶,刘尚裕,张伟新,等. 丹参有效部位的一般药理学和长期毒性研究[J]. 中国医药生物技术, 2015, 10(1): 31- 38.
- [7] 龚彦胜,李晓宇,孙蓉,等. 基于功效与药理作用川芎抗冠心病心绞痛的物质基础研究进展[J]. 中国药物警戒, 2011, 8(11): 675- 678.

(责任编辑:吴凌)

出血性中风患者色素上皮衍生因子及相关炎性细胞因子的测定和临床意义

金岗生¹, 卢一², 冯炯¹, 陈衍¹, 胡浩宇¹, 徐宾¹, 郑水红¹, 金姬³

1. 浙江中医药大学附属金华市中医医院, 浙江 金华 321000
2. 上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院, 上海 200080
3. 浙江大学医学院附属儿童医院, 浙江 杭州 310052

[摘要] 目的:观察出血性中风患者色素上皮衍生因子(PEDF)及相关炎性细胞因子的表达及其随病程的动态变化,并探讨临床意义。方法:采用前瞻性病例对照实验的研究方法,设置出血性中风组和正常对照组,对45例健康体检者和41例出血性中风患者在入院第1、3、7、14、28天的血清PEDF、血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)浓度进行检测,并计算不同病程时期的VEGF/PEDF比值。结果:出血性中风组发病第1、3、7天的血清VEGF浓度均高于正常对照组($P < 0.05$),变化趋势是第1~7天VEGF浓度逐渐增加,第7天达到高峰后开始下降,第28天降至接近正常对照组水平。与正常对照组比较,出血性中风组从发病第1天开始血PEDF浓度即降低,随着时间的增加,逐渐接近正常对照组水平。出血性中风组第1、3、7天的VEGF/PEDF值均高于正常对照组($P < 0.05$),然后缓慢降低至正常对照组水平。出血性中风组发病1、3、7、14、28天的TNF- α 、IL-6、IL-8值与正常对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论:血清VEGF、PEDF及VEGF/PEDF比值变化在出血性中风患者发病过程中有重要的临床意义,而TNF- α 、IL-6、IL-8浓度变化临床意义有限,提示VEGF/PEDF比值可以作为出血性中风患者诊断与治疗的一个监测指标。

[关键词] 出血性中风;色素上皮衍生因子(PEDF);血管内皮生长因子(VEGF);肿瘤坏死因子- α (TNF- α);白细胞介素-6(IL-6);白细胞介素-8(IL-8)

[中图分类号] R743.3 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415(2017)02-0025-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.02.008

[收稿日期] 2016-11-03

[基金项目] 浙江省中医药科技计划项目(2013ZB141);2011年度金华市科学技术研究计划(重点)项目(2011-3-015)

[作者简介] 金岗生(1959-),男,医学硕士,主任医师,研究方向:急性脑血管疾病的临床早期治疗。

[通讯作者] 金姬, E-mail: jinji2@sina.com.cn.

Determination and Clinical Significance of Pigment Epithelium-derived Factor and Related Inflammatory Cytokines in Patients with Hemorrhagic Stroke

JIN Gangsheng, LU Yi, FENG Jiong, CHEN Yan, HU Haoyu, XU Bin, ZHENG Shuihong, JIN Ji

Abstract: Objective: To observe the expression of Pigment epithelium-derived factor(PEDF) and related inflammatory cytokines, and their dynamic change with the course of disease in patients with hemorrhagic stroke, and discuss the clinical significance. Methods: Adopted prospective case controlled experiment methods to set patients with hemorrhagic stroke as hemorrhagic stroke group and health physical examination person as the normal control group. Detected concentration of serum PEDF, Vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), interleukin-8(IL-8) of 45 healthy cases and 41 patients with hemorrhagic stroke after the first, third, seventh, fourteenth and twenty-eighth day of hospitalization, and calculated VEGF/PEDF ratio in different course of disease. Results: The blood VEGF levels in the hemorrhagic stroke group were higher than those in the normal control group in the first, third, seventh day ($P < 0.05$). From the first day to the seventh day, concentration of VEGF was gradually increased, and it began to decline after reaching the peak in the seventh day and was close to the normal level of the normal control group in the twenty-eighth day. Compared with the normal control group, the blood PEDF concentration in the hemorrhagic stroke group was decreased from the first day, which was gradually close to the level of the normal control group. In the first, third, seventh day, VEGF/PEDF ratio of the hemorrhagic stroke group were all higher than that of the normal control group($P < 0.05$), which was gradually declined and close to the level of normal control group. Compared levels of TNF- α , IL-6 and IL-8 of the hemorrhagic stroke group with those of the normal control group after the first, third, seventh, fourteenth and twenty-eighth day of treatment, the differences were not significant($P > 0.05$). Conclusion: The changes of serum VEGF, PEDF and VEGF/PEDF ratio has important clinical significance in the pathogenesis of hemorrhagic stroke patients. But clinical significance of concentration changes in TNF- α , IL-6 and IL-8 was limited. It is suggested that VEGF/PEDF ratio can be regarded as an detected index for diagnosis and treatment of hemorrhagic stroke.

Keywords: Hemorrhagic stroke; Pigment epithelium-derived factor(PEDF); Vascular endothelial growth factor(VEGF); Tumor necrosis factor- α (TNF- α); Interleukin-6(IL-6); Interleukin-8(IL-8)

出血性中风是指由原发性脑实质出血引起的昏迷和瘫痪,是致残率、复发率、致死率极高的疾病。随着对出血性中风研究的深入,各种炎性细胞因子和黏附因子在脑缺血再灌注的炎症反应及其损伤中的作用日益受重视。研究证实细胞因子如血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)介导的炎症反应对出血性中风“迟发性神经元损伤(DND)”的形成有重要作用^[1]。色素上皮衍生因子(PEDF)是体内天然存在的神经营养因子,可抑制新生血管生长,减轻炎症反应,与VEGF等一起调控新生血管的发生过程^[2]。本研究观察急性出血性中风患者的血浆PEDF和一些炎性细胞因子的动态变化,分析它们的关系,以期能进一步揭示出血性中风DND的形成机理,为临床治疗出血性中风提供参考依据。

1 临床资料

1.1 纳入标准 ①符合《各类脑血管疾病诊断要点》^[3]中出血性中风的诊断标准,并具有神经功能缺损的临床表现,经头颅MRI或CT证实;②发病1周以内的患者。

1.2 排除标准 ①短暂性脑缺血发作;②脑梗死;③发病超过1周;④经检查证实由脑肿瘤、脑外伤、血液病等引起卒

中的患者,或因风湿性心脏病、冠心病及其他心脏病合并房颤,引起脑出血者;⑤合并有肝、肾、造血系统、内分泌系统等严重疾病及骨关节病、精神疾病者;⑥近1月来未服用过影响免疫功能的药物,特别是皮质类固醇,近1月来未接受过放射治疗、化学治疗和生物制剂治疗。

1.3 一般资料 取得浙江中医药大学附属金华市中医医院医学伦理委员会同意后,本研究采用前瞻性对照实验的研究方法,设置2个组别,出血性中风组为浙江中医药大学附属金华市中医医院神经内科41例新诊断为出血性中风的住院病例,发病当天抽血后开始常规药物治疗。正常对照组45例为健康体检者,2组性别、年龄等基线资料比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2 研究方法

2.1 主要试剂 上海安研生物有限公司提供的人PEDF、VEGF、TNF- α 、IL-6、IL-8抗体(ABC Biotechnology, Inc.),以及酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂和物品。

2.2 检测方法 出血性中风组分别于发病后1、3、7、14、28天早晨空腹抽取静脉血2mL,正常对照组体检时抽1次静脉血,标本采集时间及部位同出血性中风组。所有标本于室温

放置 30 min, 分离血清, -70℃ 贮存待测。用双抗体夹心 ELISA 法检测 PEDF、VEGF、TNF-α、IL-6 及 IL-8 表达水平, 试剂盒从生物工程有限公司(北京中山、上海、深圳晶美)购买, 检测步骤严格按照说明书操作。主要步骤: 包被过程(设置空白对照、阴性对照), 封闭酶标反应孔: 5% 小牛血清加满各反应孔, 置 37℃ 封闭 40 min, 用洗涤液满孔洗涤 3 遍, 每遍 3 min, 将检测血清(1:200)样品加入酶标反应孔中, 每样品至少加双孔, 每孔 100 μL, 置于 37℃, 1 h, 用洗涤液满孔洗涤 3 遍, 加入酶标抗体(根据酶结合物供应公司提供的参考工作稀释度进行), 37℃, 1 h, 每孔加 100 μL, 洗涤同前。加入 TMB- 过氧化氢尿素溶液(底物液), 每孔 100 μL, 置 37℃ 避光放置 5 min, 每孔加入终止液 50 μL 终止反应, 马上在酶标仪上测 OD₄₅₀ 值。

2.3 统计学方法 项目组成员对所有病例建立数据库, 病历资料整理入库, 实验数据编码对应, 避免出现研究对象资料不完整。所有数据采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 研究结果

3.1 2 组血清 VEGF 和 PEDF 浓度比较 见表 1。出血性中风组发病第 1、3、7 天的 VEGF 浓度均高于正常对照组($P < 0.05$), 变化趋势是第 1~7 天 VEGF 浓度逐渐增加, 第 7 天达到高峰后开始下降, 第 28 天降至接近正常对照组水平。与正常对照组比较, 出血性中风组从发病第 1 天开始 PEDF 浓度即降低, 随时间的增加, 逐渐接近正常对照组水平。出血性中风组第 1、3、7 天的 VEGF/PEDF 值均高于正常对照组($P < 0.05$), 然后缓慢降低至正常对照组水平。

表 1 2 组血清 VEGF 和 PEDF 浓度比较($\bar{x} \pm s$) ng/L

组别	时间	n	VEGF	PEDF	VEGF/PEDF
出血性中风组	第 1 天	41	205.35± 47.20 ^①	27.56± 7.90 ^①	7.37± 2.01 ^①
	第 3 天	41	208.41± 50.17 ^①	28.73± 8.92 ^①	7.83± 2.17 ^①
	第 7 天	41	215.31± 52.78 ^①	31.27± 8.72	7.41± 2.27 ^①
	第 14 天	31	202.80± 41.57	32.78± 8.25	6.18± 1.56
	第 28 天	30	187.53± 39.73	33.47± 8.41	5.87± 1.02
正常对照组		45	185.97± 53.36	34.63± 16.21	5.93± 1.99

与正常对照组比较, ① $P < 0.05$

3.2 2 组血清 TNF-α、IL-6、IL-8 浓度比较 见表 2。出血性中风组发病第 1、3、7、14、28 天的各指标值与正常对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

4 讨论

VEGF 也称血管通透性因子或血管调理素, 是一种特异作用于血管内皮细胞的强有力的多功能细胞因子, 主要由平滑肌细胞和垂体滤泡星状细胞产生和分泌, VEGF 可促使血管内皮细胞分裂、增生, 增加血管通透性并促使新生血管生成^[4]。在

表 2 2 组血清 TNF-α、IL-6、IL-8 浓度比较($\bar{x} \pm s$) ng/L

组别	时间	n	TNF-α	IL-6	IL-8
出血性中风组	第 1 天	41	66.18± 11.7	1.71± 0.71	211.29± 50.35
	第 3 天	41	67.90± 13.15	1.78± 0.69	215.47± 48.29
	第 7 天	41	66.59± 12.71	1.77± 0.67	208.64± 43.42
	第 14 天	31	67.93± 14.8	1.75± 0.77	215.08± 41.82
	第 28 天	30	64.86± 15.42	1.64± 0.74	206.56± 46.08
正常对照组		45	66.52± 18.17	1.58± 0.62	206.30± 56.71

脑出血发生后, VEGF 的表达会上调, 促进水肿区和缺血区毛细血管增生和新血管形成, 对缺血半暗区血供的改善和侧枝循环的建立具有重要意义^[5-6]。本研究对 41 例出血性中风患者血清 VEGF 浓度动态观察发现, 发病第 1、3、7 天血清 VEGF 浓度逐渐增高, 第 7 天达高峰后开始下降, 但仍维持在较高水平, 第 28 天接近正常对照组水平, 这与国内外文献^[7-8]报道基本吻合。

PEDF 现已能从人和鼠中克隆与纯化, 在正常人血浆中存在, 新生 PEDF “胶质细胞静息”效应和神经元存活特性会对许多中枢神经疾病(包括出血性中风)治疗思路的拓宽相当有益^[9]。此外 PEDF 能够抑制新生血管生长, 具有特异性和高效性, 只作用于缺血区的血管内皮细胞, 能够抑制血管生成刺激因子引起的血管内皮细胞增殖和移动, 而对正常组织的血管内皮细胞无明显的抑制作用^[10]。本研究出血性中风患者发病时血 PEDF 浓度立即降低, 然后逐渐增加, 第 14 天达到较高水平, 然后缓慢增加至接近正常对照组水平, 说明出血性中风引起的缺血缺氧对 PEDF 的表达有强烈的下调作用。PEDF 还能有效地对抗多种血管生成诱导因子, 如 VEGF、IL-8, 具有诱导内皮细胞凋亡的作用^[11]。生理状态下, VEGF 和 PEDF 之间存在一种平衡, 抑制新生血管的再生。VEGF 和 PEDF 的比例失衡与缺血诱导的视网膜新生血管以及角膜新生血管的发生发展有关^[9]。本组研究表明出血性中风患者的血清 VEGF/PEDF 比值在发病时立即升高, 持续 7 天, 然后逐渐降低, 缓慢接近正常对照组水平, 说明出血性中风患者能引起机体快速提高 VEGF/PEDF 比值并维持 7 天左右的时间, 从侧面也可以推测, VEGF/PEDF 比值可作为诊断出血性中风的一个指标。

TNF-α 是一种具有多种生物学功能的细胞因子, 主要由活化的单核-巨噬细胞所分泌。在脑出血病变中, 缺血局部组织的血脑屏障通透性增加, 外周血中的单核巨噬细胞可进入脑组织, 促使 TNF-α 等细胞因子增加^[12]。IL-6 可刺激血管内皮细胞释放白细胞趋化因子, 增加白细胞与内皮细胞的黏附性, 导致内皮细胞损伤, 促进炎症反应, 增加血脑屏障的通透性, 产生氧自由基, 促使神经细胞死亡。脑出血再灌注损伤的机制之一即过度的炎症反应, 而 IL-6 是主要的炎症因子, 能破坏血脑屏障, 增加自由基及兴奋性氨基酸的释放, 并有促进凝血作用, 加速血栓的形成, 从而参与出血性中风的发生

发展^[13]。国外学者 Tuttolomondo A 等^[1]研究表明,脑缺血后有明显的炎症反应存在,且 IL-6 的表达明显增加。IL-8 是一种多肽蛋白质,对血液中性粒细胞有强烈的趋化和激活作用,对神经组织早期炎症反应中的中性粒细胞具有趋化活性和激活作用,释放溶酶体酶和毒性氧化反应物质,促进炎症反应,加重脑损伤^[14]。本研究结果表明,出血性中风患者血清 TNF- α 、IL-6、IL-8 浓度并没有明显变化,与正常对照组比较,没有统计学差异,因此 TNF- α 、IL-6、IL-8 浓度变化在出血性中风的诊断与治疗过程中临床意义有限。

综上所述,笔者认为血清 VEGF、PEDF 及 VEGF/PEDF 比值变化在出血性中风患者发病过程中有重要的临床意义,而 TNF- α 、IL-6、IL-8 浓度变化临床意义有限,提示 VEGF/PEDF 比值可以作为出血性中风患者诊断与治疗的一个监测指标。

(致谢:本项目委托复旦大学医学院附属华山医院检验科帮助部分 ELISA 检测,主任关明和他的博士研究生协助完成这部分实验,在此表示衷心感谢!)

[参考文献]

- [1] Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, et al. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke[J]. *Curr Pharm Desl*, 2008, 14(3): 3574-3589.
- [2] Kimura R, Nakase H, Tamaki R, et al. Vascular endothelial growth factor antagonist reduces brain edema formation and venous infarction[J]. *Stroke*, 2005, 36(6): 1259-1263.
- [3] 中华神经科学会, 中华神经外科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. *中华神经科杂志*, 1996, 29(6): 379-382.
- [4] Patzer A, Zhao Y, Stöck I, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPARgamma) differently modulate the interleukin-6 expression in the peri-infarct cortical tissue in the acute and delayed phases of cerebral ischaemia[J]. *Eur J Neurosci*, 2008, 28(9): 1786-94.
- [5] Emerich DF, Silva E, Ali O, et al. Injectable VEGF

hydrogels produce near complete neurological and anatomical protection following cerebral ischemia in rats [J]. *Cell Transplant*, 2010, 19(9): 1063-1071.

- [6] O M ärg äritescu, D Pirici, C M ärg äritescu. VEGF expression in human brain tissue after acute ischemic stroke [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2011, 52(4): 1283-1292.
- [7] Hayashi T, Wang XO, Zhang HZ, et al. Induction of platelet derived-endothelial cell growth factor in the brain after ischemia[J]. *Neurol Res*, 2007, 29(5): 463-468.
- [8] 官俏兵, 张晓玲, 王琰萍, 等. 血清血管生长因子浓度变化与急性脑梗死后神经功能康复的关系[J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(5): 726-728.
- [9] Ji D, Li M, Zhan T, et al. Prognostic role of serum AZGP₁, PEDF and PRDX₂ in colorectal cancer patients[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(6): 1265-1272.
- [10] Petersen SV, Valnickova Z, Enghild JJ. Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood: purification and characterization [J]. *Biochem J*, 2003, 374 (Pt 1): 199-206.
- [11] Takenaka K, Yamagishi S, Jinnouchi Y, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MG63 human osteosarcoma cells[J]. *Life Sci*, 2005, 77(25): 3231-3241.
- [12] Georg P, Hannah H, Straub RH, et al. B cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) behaves as an acute phase reactant in acute pancreatitis[J]. *Plos One*, 2013, 8(1): e54297.
- [13] Dziedzic T, Gryz EA, Turaj W, et al. Serum interleukin-6 soluble receptor in relation to interleukin-6 in stroke patients [J]. *J Mol Neuro Sci*, 2004, 24(2): 293-298.
- [14] 狄政莉, 万琪, 王洪典, 等. 脑缺血再灌注后 IL-8 与微血管炎症损伤关系的实验研究[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2004, 11(2): 89-90.

(责任编辑:吴凌)