脐血源神经干细胞应用的临床安全性评价

吴芳 杨万章 张敏 杨佳勇 梁豪文 盛佑祥 赵宁 杨志刚 唐映

深圳市第六人民医院康复医学科（518052）

摘要：目的：评价人脐血源神经干细胞临床应用的安全性。方法：①实验对象：选取2005年8月~2007年6月在本科住院和门诊治疗各种神经系统疾病病患达264人次。实验经医院医学伦理委员会批准，所有患者及其家属对治疗方案均知情同意。新生儿脐血由河南省红十字血液中心提供，患者及其家属均签署知情同意书。②实验方法：干细胞来自健康分娩孕妇的脐带血（检测HIV,梅毒抗体、肝炎标志物5项、TORCH5项等），经由深圳市北科细胞工程研究所进行分离，提取、培养、扩增及向神经干细胞诱导传代4-6代。每份细胞数量约达1.5-3.0×107/ml，其中约80%间质干细胞，20%神经前体细胞。4次为1疗程，最大治疗次数8次，最少2次。脑瘫、截瘫及其他疾病患者最多3疗程，部分2疗程。治疗途径：局部、静脉、脑脊液循环途径穿刺植入（侧脑室，颈池，腰池）。方法参考文献[1]。③实验评估：干细胞治疗前及结束后测定血尿常规、肝肾功能、电解质、血清酶学、血清免疫蛋白及补体、 T细胞亚群；观察细胞移植过程中及移植后的不良反应。

关键词：神经系统疾病；安全性评价；脐血间质干细胞

益神启窍方及综合疗法对持续性植物状态患者脑脊液氨基酸含量的影响[31]

丰广魁[1] 奚肇庆[2] 王培东[3] 吴春平[3] 马虎龙[3] 王爱萍[3] 张耀军[3] 刘冲[3] 杨娜[3] 刘燕[3]

1、江苏省连云港市中医院；2、江苏省中医院；3、南京紫金医院；

摘要 目的：探明益神启窍方对PVS患者脑脊液氨基酸含量的影响。方法：随机将患者分为中药组19例、常规组14例，常规组采用高压氧、改善脑代谢、对症、支持等，中药组是常规组加益神启窍方，疗程2个月，采用高效液相测定脑脊液17种氨基酸含量；结论：治疗后苏氨酸（Thr）中药组显著升高（P<0.005），丝氨酸（Ser）两组均显著降低（P<0.05）。组间有显著差异（P<0.05）中药组比常规组降低显著。

关键词 益神启窍方 脑脊液 氨基酸

“持续性植物状态(PVS)是一种特殊的意识障碍。其特征是患者睁眼若视，貌似清醒，但无任何意识活动，对自身及周围环境缺乏认知，有不规则的睡眠—醒觉周期。随着急诊水平的提高，急重症死亡率明显降低，而出现大量PVS病人。我们从2005、8－2006、12采用自拟中药益神启窍方，在常规综合疗法的基础上，并以此为对照干预，观察中药益神启窍方对PVS患者血清氨基酸含量的影响。

1 资料

所有病人均来自南京紫金医院的住院病人，从2005年8月－2006年11月共入组33例。根据入院先后随机分成常规组（简称A组），和中药组（简称B组），两组一般情况比较各项比较均无显著差异（P＞0.05），具有可比性。

2．方法

2．1 诊断标准：根据中华医学会高压氧医学分会脑复苏专业组于2001、11讨论制定的诊断标准制定(1)。排除年龄＞75岁；有帕金森、老年性痴呆、血管性痴呆病史；严重肝肾损害者及PVS病程＞13个月。

[31]江苏省中医药局课题，项目编号：H05026

2．2 脑脊液氨基酸含量测定：标本每次采样在9：00～10：00时以常规无菌腰穿抽取脑脊液，先放弃前3ml后，再采集3mL；加等量乙腈振荡3min，放置10min，置于12000r/min，4℃高速低温离心机离心5min，取上清液各分装于3个小试管，每管约0.6～1.0ml，均置于-80℃的冰箱中保存。测定方法采用美国Waters公司高效液相色谱分析仪。所有试剂均用三蒸水配制，流动相配方：A液：每1000ml中0.94g三水醋酸钠，（调至PH值6.50），25ml乙腈，0.45μm滤膜抽滤；B液：每1000ml中450ml乙腈，400ml三蒸水，150ml甲醇；衍生化试剂配方： PITC:甲醇:乙醇:三水乙氨:水＝1:6:1:1:1。将标本干燥加衍生化试剂，再干燥，进样时用A液稀释，B液剃度洗脱，流动相流速1 ml/min，用PICO－TAG氨基酸呼吸专用柱，柱温46℃，75分钟17种氨基酸分离完毕。

2．3 治疗方法

常规组：采用高压氧，针灸，电刺激，营养支持，处理并发症等。高压氧每日1次，每10次为1疗程；改善脑代谢及微循环：美多芭、溴隐停全程服用，其它择情使用，10天一疗程；电刺激数种选择性使用，1个月一个疗程；针灸15次一个疗程。

中药组：应用益神启窍方（黄芪，当归，麝香，桃仁，石菖蒲，白芷），采用中药配方颗粒（来自江阴天江药业）冲服，麝香产地：西藏。中药组其他治疗均与常规组相同，两组相关情况比较见表4、表5、表6，具有可比性。两组不能经口喂服的均采用鼻饲或胃造瘘管给药，疗程为2个月。

表4 两组治疗方法相关情况比较1

组别		高压氧		营养餐	能全力等	静脉营养	抗感染	抗癫痫	处理应激溃疡出血
	例数	疗程（个）		例数	例数	例数	例数	例数	例数
A组	14	5.25±1.16		14	6	3	11	9	4
B组	19	4.95±1.08		19	12	2	17	16	3
t或x^2值		0.773			2.425	0.745	0.745	1.742	0.788

P＞0.05

表5 两组治疗方法相关情况比较2

组别	例数	氯脂醒		谷红注射液		灯盏花素		谷胱甘肽		三磷酸胞甘二钠	
		例数	疗程	例数	疗程	例数	疗程	例数	疗程	例数	疗程
A组	14	13	2.15±1.07	5	1.80±1.10	8	2.00±1.07	3	4.7	7	2.00±0.58
B组	19	14	1.87±1.13	9	1.44±0.53	15	2.20±0.94	1	1	12	2.25±1.14
T、x^2值		1.992	0.689	0.448	0.833	1.815	0.464	1.977		0.571	0.538

P＞0.05

表6 两组治疗方法相关情况比较3

组别	例数	甲捷		胞二磷		电刺激						针灸	
						小脑顶核		周围神经		低频			
		例数	疗程	例数	疗程	例数	疗程	例数	疗程	例数	疗程	例数	疗程(个)
A组	14	0	0	4	2.0	4	1.75±0.50	5	1.80±0.45	1	1	8	4
B组	19	2	1.5	1	1.0	9	1.89±0.33	10	1.90±0.32	0	0	14	4
T、x^2值		1.569		3.406		1.193	0.599	0.93	0.505	1.4		0.992	

P＞0.05

2．6 统计学方法：计数资料采用卡方检验，计量资料采用t检验。所有数据应用SPSS11.5进行数据统计。

3．结果

3．1 两组脑脊液氨基酸含量比较：两组脑脊液治疗前组间比较均无差异（P＞0.05），治疗后丝氨酸（Ser）两组均降低，中药组降低显著，组间有显著差异（P＜0.05），其余氨基酸无

显著差异。详见表 7

表 7 两组脑脊液氨基酸含量的比较（$\bar{x}\pm s$,μmol/ml）

氨基酸	常规组		中药组	
	前	后	前	后
Asp	0.050±0.074	0.036±0.062	0.036±0.045	0.020±0.019
Glu	0.026±0.015	0.020±0.011	0.024±0.023	0.017±0.011
Ser	0.100±0.037	0.086±0.028	0.11±0.064	0.066±0.020*
Gly	0.059±0.033	0.061±0.039	0.062±0.390	0.049±0.031
His	0.112±0.089	0.102±0.057	0.111±0.060	0.103±0.053
GaBa	0.037±0.032	0.027±0.011	0.032±0.017	0.029±0.018
Thr	0.089±0.031	0.158±0.159	0.095±0.023	0.145±0.048
Ala	0.102±0.047	0.118±0.045	0.104±0.057	0.112±0.031
Arg	0.112±0.078	0.089±0.044	0.129±0.108	0.085±0.043
Pro	0.048±0.041	0.038±0.028	0.043±0.031	0.033±0.015
Tyr	0.134±0.085	0.105±0.060	0.132±0.093	0.097±0.054
Val	0.081±0.037	0.091±0.045	0.086±0.066	0.089±0.031
Met	0.068±0.044	0.075±0.031	0.074±0.036	0.078±0.042
Ile	0.044±0.027	0.053±0.049	0.044±0.027	0.043±0.024
Leu	0.209±0.131	0.208±0.117	0.207±0.165	0.175±0.186
Phe	0.040±0.019	0.043±0.019	0.038±0.029	0.044±0.014
Lys	0.036±0.021	0.045±0.017	0.039±0.027	0.052±0.025

*Ser 后 t=2.337，P=0.026；

3.2 两组组内治疗前后脑脊液氨基酸含量比较：两组治疗“前”与治疗“后”比较，丝氨酸（Ser）降低，两组均有显著差异（P＜0.05），苏氨酸（Thr）升高，中药组有极显著差异（p=0.000），其余氨基酸无显著差异。详见表 8

表 8 两组组内治疗前后脑脊液氨基酸含量的比较（$\bar{x}\pm s$ μmol/ml）

氨基酸	常规组(A)		中药组(B)	
	前	后	前	后
Asp	0.050±0.074	0.039±0.064	0.040±0.047	0.015±0.010
Glu	0.026±0.015	0.020±0.011	0.024±0.023	0.017±0.011
Ser	0.104±0.038	0.086±0.028*	0.098±0.048	0.066±0.020*
Gly	0.059±0.033	0.061±0.039	0.062±0.039	0.049±0.031
His	0.112±0.089	0.102±0.057	0.103±0.049	0.103±0.053
GaBa	0.037±0.032	0.027±0.011	0.032±0.017	0.029±0.018
Thr	0.089±0.031	0.158±0.159	0.095±0.023	0.145±0.048*
Ala	0.102±0.047	0.118±0.045	0.104±0.057	0.112±0.031
Arg	0.112±0.078	0.089±0.044	0.129±0.108	0.085±0.043
Pro	0.048±0.041	0.038±0.028	0.044±0.031	0.033±0.015
Tyr	0.134±0.085	0.105±0.060	0.114±0.049	0.097±0.054
Val	0.081±0.037	0.091±0.045	0.086±0.066	0.087±0.031
Met	0.068±0.044	0.075±0.031	0.074±0.036	0.078±0.010
Ile	0.044±0.027	0.053±0.049	0.044±0.027	0.043±0.024
Leu	0.209±0.131	0.208±0.117	0.207±0.165	0.175±0.186
Phe	0.040±0.019	0.043±0.019	0.038±0.029	0.044±0.014

Lys	0.036±0.021	0.045±0.017	0.039±0.027	0.052±0.025

*Ser A组 t=2.475，P=0.028, B组 t=2.757，P=0.013； Thr B组 t=5.340，P=0.000；

3．3 氨基酸高效液相波谱

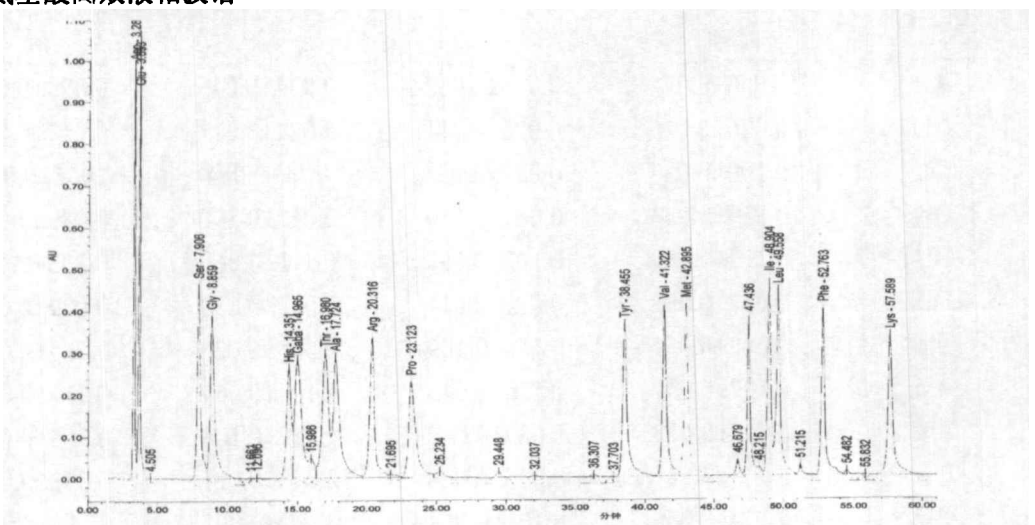


图 2－8 标准品

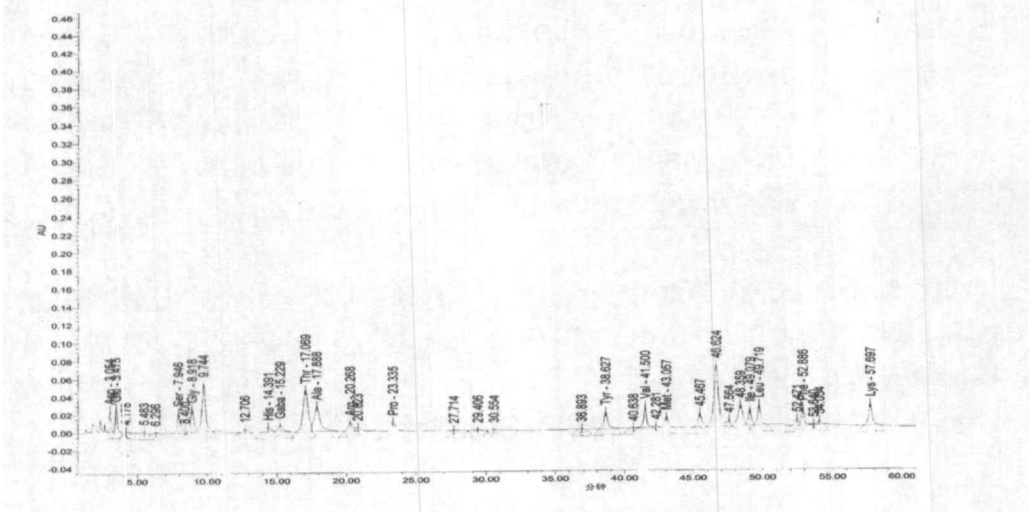


图 2－9 脑脊液

4．讨论

氨基酸是一类重要的神经递质，分兴奋性（EEA）和抑制性氨基酸(IAA)两类。在脑损伤或脑缺血、出血急性期，EAA 和 IAA 类递质都呈上升趋势，但随着病情的好转，递质水平又逐渐降至正常[5][6][7]。也有报道[8]，在 PVS 患者中氨基酸类递质水平与患者 PVS 评分呈负相关。γ－GABA、Ser、Tyr、色氨酸、赖氨酸、胍氨酸比健康对照组显著升高，血浆 Glu、Arg 显著升高，显著降低的有胱氨酸[9]。本实验部分氨基酸升高，高于文献健康组[8][9]，但并不一致。PVS 患者 CSF 氨基酸水平升高说明氨基酸呈失调状态，导致原因可能是脑组织损伤，血脑屏障破坏的缘故。PVS 是一种特殊的病理生存状态，高水平的氨基酸含量对 PVS 是利是害尚不清楚，氨基酸水平升高是其代偿机制，还是导致疾病的始动因素？IAA 的升高也许是为了平抑 EAA 水平过高的结果，脑脊液 Glu 等 EAA 含量增高能否促醒 PVS 患者，Gly 等 IAA 水平升高是否会延迟 PVS 的清醒都是个迷！氨基酸是否参与 PVS 的发病，如何参与都尚不清楚，可能氨基酸水平对 PVS 发病的影响与急性脑损伤、急性脑缺血缺氧时的影响有所不同，后者的高含量的 EEA 的神经毒性反应可能在 PVS 中并不十分突出，而且可能会是促使其回苏的重要因素。两组治疗前后 EAA Asp、Glu、Leu 等与 IAA γ－GABA 等 CSF 中均呈降低趋势，说明上述氨基酸 CSF 中水平的降低与临床病情好转呈负

相关。而 IAA　Ala 则呈升高趋势，Gly 中药组呈下降趋势，说明 IAA 水平升高是影响 PVS 患者清醒的因素之一，γ－GABA 因受谷氨酸水平的影响而表现不一致。Thr、Val、苯丙氨酸、赖氨酸治疗前后均呈升高趋势，Arg 则呈降低趋势尚不清楚其机理。

数据显示，治疗后中药组显著升高的有苏氨酸（Thr）（P<0.005），显著降低的有丝氨酸（Ser）（P<0.05）。常规组显著降低的有丝氨酸（Ser）（P<0.05）。显著改变的只是少数，有升高的、也有降低的，各种氨基酸含量的升降与 PVS 评分高低与脱离植物状态的例数的多少是否有紧密关系尚不十分清楚，两组治疗后氨基酸含量有显著差异的有 Ser 中药组比常规组降低显著（P<0.05）；表明中药组调节失调的氨基酸水平作用优于常规组。

益神启窍方是一张经验方，方中集益气养血，活血化痰，醒脑开窍于一炉，药性平和，无毒烈峻猛之品，结合现代药理研究，取兴奋脑神经之品，而避用中医传统之醒脑开窍而现代药理研究以镇静为主之品（如冰片、牛黄），体现了PVS这种特殊的神昏中医治法的灵机应变，益神、启窍而不镇静。兴奋而不抑制。方中黄芪补中益气升阳，增强机体的代谢[16]和抗衰老、抗应激能力[17]，能降低脑血管阻力；当归补血活血。能改善循环、抗凝、抗贫血[18][19]；麝香为开窍醒神之要药，小剂量有兴奋大脑的作用，麝香酮可以改善实验动物的大脑缺血与缺氧，改善中枢神经系统的功能[20]。麝香对中枢有增强缺氧的耐受力，能显著延长急性呼吸停止后脑电波存在的时间[21]；桃仁活血祛瘀，降低血管阻力、抗凝[22]，石菖蒲开窍豁痰，兴奋中脑和大脑，具有减轻神经细胞缺氧损伤的作用，对脑缺血－再灌注诱导的神经细胞凋亡有保护作用；白芷辛温通窍，有中枢兴奋作用和扩张血管作用[23]。

有关中药对脑神经递质的影响报道不多，而尚未见到有关对PVS脑脊液氨基酸含量的影响报道。我们的观察发现，总体上，对脑脊液的氨基酸水平呈降低作用。益神启窍方是如何调节氨基酸失调的还尚不清楚，确切机理有待进一步研究。

参考文献

1. 会议纪要.《关于修订我国持续性植物状态(PVS)诊断和疗效标准》专家会议纪要[J]. 中华急诊医学杂志，2002，11（4）：241
2. Tabeuehi A. Excitatery amino acid transmitters：past，present，and fu. tule. In： Kan azawal，ed Neurotran smittors focus on excitatory amino acids. Tokyo：Exeerpta，1998，395
3. 邱小鹰，梅元武，王何，等. 脑温改变对大鼠脑缺血灌注组织兴奋性氨基酸的影响[J]. 中国临床康复，2003，7(19)：2662-3
4. 李强，潘莉莉.反相高效液相色谱法测定脑梗塞患者血浆氨基酸[J].辽宁医学杂志，1999，13（3）：140－141
5. Baker AJ. Moulton RJ. MacMillan VH, et al.Excitatory amino acids in cerebrosp inal fluid following traumatic brain injury in J Neuroswg 1993，79(3)：369-373
6. Castillo J，Davaloa A，Naveiro J，et al.Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke.stroke.1996，27(6)：1060-1065
7. 张中兴，卢江，张萍，等. 脑梗死后血、脑脊液中兴奋性氨基酸变化与神经功能缺失的关系[J].中国临床康复，2003，7(25)：3422—3
8. 郭燕舞，等.持续性植物状态患者意识状态与氨基酸类神经递质水平的关系[J].中国临床康复，2004，8（4）：629－631
9. 胡学芳，等.持续性植物状态患者血浆、脑脊液中氨基酸水平的变化[J].中国应用生理学杂志，2003，19（3）：248－249
10. 云秦川. 中药黄芪的药理研究进展[J]. 内蒙古中医药，2004，(6)：33－34
11. 樊红灿，等. 绵毛黄芪总苷的抗氧化作用[J]. 中国药理通讯，1989，6(2)：54
12. 徐理纳. 当归对麻醉犬外周血管的扩张作用[J]. 中华医学杂志，1980，60(2)80
13. 马兰芳. 当归多糖对造血细胞生成影响的实验研究[J]. 中华血液学杂志，1988，(3)：148

14. 李保英. 麝香对小鼠脑损伤的影响[J]. 国外医学·中医中药分册,1996，18 (5)：33
15. 叶启智，唐光风. 麝香对兔的唤醒作用及对清醒兔脑电图和行为的影响[J]. 广西中医药，1986，9 (3)：131－133
16. 李仪奎，胡月娟，等. 麝香对中枢耐缺氧能力的影响[J]. 中草药，1985，16(3)：19-21
17. 赵润芝，等.桃仁药理作用的研究[J]. 上海中医药与临床，1985，（创刊号）105
18. 方永奇，吴启端，等. 石菖蒲对中枢神经系统兴奋－镇静作用研究[J]. 广西中医药，2001，24 (1)：49
19. 蒋红兰，匡忠生，等. 石菖蒲冰片对神经细胞缺氧性损伤的保护作用[J]. 广州中医药大学学报,2003，20（1)：63－65
20. 匡忠生，谢宇晖，李翎，等. 石菖蒲提取液对脑缺血-再灌注诱导的神经细胞凋亡保护作用[J]. 广东医学，2002，23(5)：459
21. 赖真，王沙燕，耿小茵.等补阳还五汤和黄芪对沙土鼠脑缺血再灌注后脑组织兴奋性氨基酸的影响[J]. 北京中医药大学学报，2002，25（3)：33－35
22. 刘亚敏，张赐安，等.麝香、冰片对全脑缺血再灌注大鼠脑组织氨基酸类神经递质的影响[J]. 中药新药与临床药理，2002，12（4)：231－233
23. 唐洪梅，席 晖，吴 敏，等. 石菖蒲对小鼠脑组织氨基酸类神经递质的影响[J]. 中药新药与临床药理，2004，15(5)：310-311

236例脑外伤后综合征患者中医证候学多元统计分析

刘金民 疏欣杨
北京中医药大学东方医院急诊科

摘要：目的 对脑外伤后综合征中医证候学调查资料进行多元统计分析，探讨该病主要中医临床证候类型.方法 前瞻性结合回顾性调查分析总结236例脑外伤后综合征中医证候学资料，形成脑外伤后综合征Epidata3.0中医证候数据库，最后对脑外伤后综合征中医证候学数据库进行多元统计分析挖掘，归纳总结出该病主要中医临床证候类型. 结果 类气虚亏虚证、类肝阳上亢证、类肝肾阴虚证、类气虚血瘀证、类瘀恋脑络证、类痰浊中阻证、类脑髓不足证和类脾气虚证等8类证候是脑外伤后综合征中医临床基本证候类型。

关键词：脑外伤后综合征 中医证候学 多元统计分析

急性颅脑损伤是神经外科常见急症，也是急性创伤常见原因，据Mcnair[1]估计全球颅脑损伤的发生人数占所有创伤人数的六分之一，每年车祸、坠落、袭击、运动造成颅脑损伤约七百万人。而在颅脑外伤存活患者中，约10%的轻度损伤患者会遗留永久的残疾，而中度和重度患者这一比例达到66%和100%。目前，脑外伤后综合征（Post Traumatic Brain Sydrome，PTBS）中医症状证候规律的研究较少，故本文试用多元统计分析方法对脑外伤后综合征患者中医证候规律进行了初步探讨。

1 临床资料

1.1 病例选择标准

1.1.1 西医诊断标准（参照CCMD-Ⅱ、Ⅲ-R的诊断标准）

（1）病史：有明确的颅脑外伤伴短暂的意识障碍病史。

（2）颅脑损伤后出现的以下症状(目前的症状与脑外伤相关)：

不同程度的认知功能障碍，表现为注意力、记忆力及智力等功能的损害。头痛较为常见，以弥漫性头部胀痛和博动性头痛为主，持久而严重，闻声，用力后加重；头昏亦多见，感到思维混乱，有昏晕感；其它表现如眩晕，恶心，易疲劳，注意力不集中，睡眠障碍，多汗，耳鸣，心悸、情绪不稳，易激惹，发怒、记忆减退、思维吃力等。